

应用复合磷脂脂质体人工皮肤膜表征香附四物汤活性部位生物药剂学性质

马 敏^{1,2}, 瞿叶清³, 姜叶婷¹, 李 钰¹, 朱学敏¹, 刘 培², 顾 薇¹, 徐 飞¹, 陈 军^{1*}, 段金威²

1. 南京中医药大学药学院 药物制剂研究室, 江苏 南京 210023

2. 南京中医药大学 江苏省中药资源产业化过程协同创新中心, 江苏 南京 210023

3. 南京大学医学院附属鼓楼医院 动物实验中心, 江苏 南京 210008

摘要: 目的 评价应用复合磷脂脂质体人工皮肤膜 (CPLASM) 测定参数表征香附四物汤 (XSD) 活性部位透皮吸收生物药剂学性质的可行性。方法 建立 HPLC 方法同时测定 XSD 活性部位中活性成分 (阿魏酸、四氢非洲防己碱、延胡索乙素、洋川芎内酯 I、洋川芎内酯 H) 的质量分数并测定其油水分配系数。制备 CPLASM, 用其测定 XSD 活性部位的体外透皮吸收参数, 并与猪耳皮测得的透皮吸收参数进行比较。结果 XSD 活性部位 (pH 5.5) 中阿魏酸、四氢非洲防己碱、延胡索乙素、洋川芎内酯 I、洋川芎内酯 H 的油水分分配系数分别为 1.220 ± 0.280 、 0.670 ± 0.085 、 0.920 ± 0.110 、 1.040 ± 0.092 、 1.030 ± 0.093 ($n=3$)。应用 CPLASM 和猪耳皮测得的各成分透皮吸收参数显著相关, 相关系数均高于 0.9。与经典的油水分分配系数相比, 5 种活性成分透过 CPLASM 6 h 的累积透过率可以有效表征其透过猪耳皮的渗透系数。结论 应用 CPLASM 测定中药活性成分体外透皮吸收参数能够有效表征中药活性部位的生物药剂学性质。

关键词: 香附四物汤; 生物药剂学; 复合磷脂; 脂质体人工皮肤膜; 透皮吸收; 阿魏酸; 四氢非洲防己碱; 延胡索乙素; 洋川芎内酯 I; 洋川芎内酯 H

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)05-1048-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.05.009

Study on biopharmaceutical properties of active fraction from Xiangfu Siwu Decoction by composite phospholipid liposome-based artificial skin membrane

MA Min^{1,2}, QU Ye-qing³, SHU Ye-ting¹, LI Yu¹, ZHU Xue-min¹, LIU Pei², GU Wei¹, XU Fei¹, CHEN Jun¹, DUAN Jin-ao²

1. Pharmaceutical Research Laboratory, School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

2. Jiangsu Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

3. Animal Experiment Center, the Affiliated Drum Tower Hospital of Medical School of Nanjing University, Nanjing 210008, China

Abstract: Objective To evaluate the feasibility of the application of composite phospholipid liposome-based artificial skin membrane (CPLASM) for measuring biopharmaceutical properties of active fraction extracted from Xiangfu Siwu Decoction (XSD) via transdermal administration. **Methods** The HPLC method was established for the determination of active ingredients (ferulic acid, tetrahydrocolumbamine, tetrahydropalmatine, senkyunolide I, and senkyunolide H) in active fraction of XSD. The oil/water partition coefficient values of these active ingredients were measured. The CPLASM was prepared to determine the *in vitro* permeability parameters of active fraction of XSD. The obtained parameters were further compared with those obtained by porcine ear skin. **Results** The oil-water partition coefficients of ferulic acid, tetrahydrocolumbamine, tetrahydropalmatine, senkyunolide I, and senkyunolide H in active fraction of XSD (pH 5.5) were measured to be 1.220 ± 0.280 , 0.670 ± 0.085 , 0.920 ± 0.110 , 1.040 ± 0.092 , 1.030 ± 0.093 ($n=3$), respectively. The permeability parameters of the active ingredients through porcine ear skin and CPLASM indicated a significant

收稿日期: 2017-10-09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81573555); 江苏省中医药管理局科研专项课题 (ZX2016D1); 江苏省中药资源产业化过程协同创新中心重点项目 (ZDXMHT-1-15); 江苏省优秀青年基金项目 (BK20160097); 江苏省高校优势学科资助项目 (2014); 江苏省普通高校学术学位研究生科研创新计划项目 (KYLX16_1161); 南京中医药大学中药学优势学科专项培育项目 (2017-1)

作者简介: 马 敏 (1992—), 山东济南人, 硕士研究生。E-mail: 1175162522@qq.com

***通信作者** 陈 军 (1975—), 江苏泰州人, 博士, 教授, 主要从事中药经皮给药系统研究。Tel: (025)85811769 E-mail: chenjun75@163.com

correlation ($r > 0.9$). Compared with the classical oil-water partition coefficients, the 6 h- cumulative permeation ratio of five active ingredients through CPLASM can be characterized as effectively predicting permeability parameters through porcine ear skin.

Conclusion The biopharmaceutical properties of active fractions from Chinese material medica can be effectively characterized by the application of CPLASM for the determination of *in vitro* permeability parameters of active ingredients.

Key words: Xiangfu Siwu Decoction; biopharmaceutical properties; composite phospholipid; liposome-based artificial skin membrane; transdermal absorption; ferulic acid; tetrahydrocolumbamine; tetrahydropalmatine; senkyunolide I; senkyunolide H

香附四物汤^[1] (Xiangfu Siwu Decoction, XSD) 出自清代梁廉夫《不知医必要》卷四, 由当归、川芎、白芍、熟地黄、木香、香附、延胡索 7 味药组成, 具有养血调血、行气止痛之功效, 主治气滞血瘀所致痛经、月经不调等症^[2-3]。前期研究表明, XSD 水煎液经大孔树脂吸附、一定浓度乙醇洗脱部位具有较强的镇痛和免疫活性^[4]。在此基础上, 已将 XSD 活性部位制成透皮贴剂治疗痛经并考察其体外透皮吸收行为^[5-6]。

与口服相比, 透皮吸收因为吸收机制单纯, 生物药剂学表征结果与体内吸收行为的一致性可能会更高, 并且随着脂质人工皮肤膜技术^[7]的日趋成熟, 本课题组前期研制了能够同时模拟皮肤角质层脂质组成和“砖-砂浆”结构的脂质体人工皮肤膜 (liposome-based artificial skin membrane, LASM)^[8], 并应用复合磷脂 (composite phospholipid, CP) 技术有效控制其屏障功能^[9-10], 直接测定透皮参数有望取得比理化参数预测更好的表征效果。本实验在制备分离 XSD 活性部位的基础上, 建立相关分析方法, 考察了其对猪耳皮的透皮行为, 并且比较了测定油水分配系数与应用复合磷脂脂质体人工皮肤膜 (CPLASM) 表征生物药剂学性质结果与实际透皮吸收行为的相关性, 以期建立一种更为准确实用的中药活性部位生物药剂学性质表征方法。

1 仪器与材料

1.1 药材与试剂

当归为伞形科当归属植物当归 *Anglica sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根, 川芎为伞形科藁本属植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 的干燥根茎, 白芍为毛茛科芍药属植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥根, 熟地黄为玄参科地黄属植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch 的块根炮制加工品, 香附为莎草科莎草属植物莎草 *Cyperus rotundus* L. 的干燥根茎, 木香为菊科植物云木香 *Aucklandia lappa* Decne 的干燥根, 延胡索为罂粟科紫堇属植物延胡索 *Corydalis yanhusuo* W. T. Wang 的干燥块茎, 药材饮片均购自于苏州市天灵中药饮片有限公司, 经南京

中医药大学段金廛教授鉴定均符合《中国药典》2015 年版一部要求。

D101 大孔树脂, 西安蓝晓科技有限公司; 95% 乙醇, 南京南奥科技有限公司; 甲醇, 色谱纯, 德国 Merck 公司; 三乙胺, 分析纯, 上海沪试化工有限公司; 乙酸, 分析纯, 南京化学试剂公司; 超纯水, 由 Direct-Q5 超纯水系统制备; 对照品洋川芎内酯 I (批号 YCZI20160113)、洋川芎内酯 H (批号 YCZH20160601)、四氢非洲防己碱 (批号 SQJJ20151130)、阿魏酸 (批号 20150112)、延胡索乙素 (批号 YHYS20150819), 质量分数均 $\geq 98\%$, 均购自南京春秋生物有限公司; 卵磷脂 (EPC, PC-98T, 注射级, 批号 AL14014)、胆固醇 (注射级, 批号 B40333)、氢化大豆磷脂 (HSPC, 注射级, 批号 A70888) 购自上海艾韦特医药科技有限公司; 胆固醇硫酸酯 (批号 L68034) 购自山东西亚试剂公司; 棕榈酸 (批号 20150106)、神经酰胺 (批号 20150106) 均购自南京生利德生物科技有限公司。尼龙膜, 直径 47 mm, 孔径 0.45 μm , 批号 R5DA90908, 美国 Millipore 公司; Transwell 24 孔嵌套板, 嵌套直径 6.5 mm, 膜孔径 8.0 μm , 批号 20115014, 美国康宁公司。

1.2 动物

巴马小型猪, 体质量 20 kg, 购自上海南汇区老港镇华新特种养殖场, 合格证号 SCXK (沪) 2012-0013; 饲养条件: 普通级环境, 温度 16~28 $^{\circ}\text{C}$, 湿度 40%~70%。

1.3 仪器

DNS-0.2 单效浓缩器、TQG-0.3 提取液贮罐、TQG-0.3 提取罐, 南京同皓干燥设备有限公司; R-220SE 旋转蒸发仪, 瑞士 Buchi 公司; FD-1A-50 型冷冻干燥机, 北京博医康实验仪器有限公司; Waters2695 高效液相色谱系统及四元泵、Waters 2996PDA 二极管阵列检测器, 美国 Waters 公司; SB25-12DTD 超声波清洗器, 南京以马内利公司; BT-52S 十万分之一天平, 德国赛多利斯公司; TK-12D 透皮扩散试验仪, 上海楷凯科技贸易有限

公司; Direct-Q5 型超纯水系统、Millicell-ERS02 型细胞膜电阻测定仪, 美国 Millipore 公司; SHZ-D 型循环水式真空泵, 巩义市予华仪器有限责任公司; MicroCL21R 型高速冷冻离心机, 美国 Thermo Fisher 公司; RE-52A 型旋转蒸发器, 上海亚荣生化仪器厂; Zetasizer Nano Zs90 纳米粒度仪, 英国马尔文仪器有限公司; JY92-II 超声波细胞粉碎机, 浙江宁波新芝生物科技股份有限公司; DKZ-2 电热恒温振荡水浴槽, 上海精宏实验设备有限公司; 5810R 离心机, 德国 Eppendorf 公司; TENSOR37 型傅里叶中-近红外光谱仪, 德国 Bruker 公司; Emulsiflex C3 型高压均质机, 加拿大 Avestin 公司。

2 方法与结果

2.1 XSD 活性部位的制备

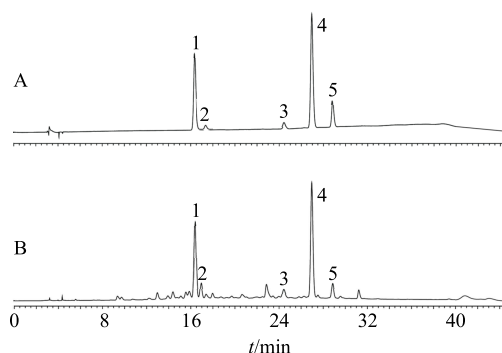
取当归 4.50 kg、熟地黄 6.00 kg、川芎 2.25 kg、白芍 2.25 kg、延胡索 2.25 kg、香附 2.25 kg、木香 1.50 kg, 加 10 倍量水浸泡 12 h 后连续煎煮 2 次, 合并 2 次煎出液。将水煎液浓缩至生药质量浓度 1 g/mL。浓缩液用 95% 乙醇调至乙醇体积分数为 80%, 静置 24 h, 取上清液浓缩至无醇味。浓缩液经大孔吸附树脂以纯水及 10%、20%、30%、40%、50% 乙醇梯度洗脱^[4], 收集 50% 乙醇洗脱部位, 浓缩、冷冻干燥后备用, 即得 XSD 活性部位, 得率为 0.19%。

2.2 XSD 活性部位中主要组分的定量测定

2.2.1 对照品及供试品溶液的制备 精密称取对照品阿魏酸、延胡索乙素、四氢非洲防己碱、洋川芎内酯 I、洋川芎内酯 H 适量于 10 mL 量瓶中, 得到混合对照品溶液, 质量浓度分别为 250、131、108、504、118 $\mu\text{g/mL}$ 。精密称取 XSD 活性部位粉末适量, 用 50% 甲醇超声溶解并定容, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液过 0.45 μm 滤膜, 滤液为供试品溶液。

2.2.2 色谱条件 流动相为乙腈-含 0.8% 乙酸的 0.2% 三乙胺水溶液, 梯度洗脱: 0~20 min, 15%~25% 乙腈; 20~35 min, 25%~40% 乙腈; 35~38 min, 40%~60% 乙腈; 38~40 min, 60% 乙腈; 40~45 min, 60%~15% 乙腈; 体积流量 0.8 mL/min; 检测波长 280 nm; 进样量 10 μL ; 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$ 。色谱图见图 1。

2.2.3 线性关系考察 将“2.2.1”下混合对照品溶液分别用甲醇稀释成 6 份不同质量浓度的混合对照品溶液。12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液。按“2.2.2”项下液相色谱条件, 分别进样, 以峰面积(Y)



1-阿魏酸 2-四氢非洲防己碱 3-延胡索乙素 4-洋川芎内酯 I
5-洋川芎内酯 H
1-ferulic acid 2-tetrahydrocolumbamine 3-tetrahydropalmatine
4-senkyunolide I 5-senkyunolide H

图 1 混合对照品 (A) 和 XSD 活性部位供试品 (B) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of mixed reference solution (A) and sample solution (B) of active fraction of XSD

和质量浓度(X)进行线性回归, 得回归方程, 信噪比(S/N)为 10 的质量浓度($\mu\text{g/mL}$)为最低定量限(LOQ), 结果分别为阿魏酸 $Y=99\,710\,X-279\,503$, $r=0.999\,5$, 线性范围 3.91~250.00 $\mu\text{g/mL}$, LOQ 为 0.70 $\mu\text{g/mL}$; 四氢非洲防己碱 $Y=10\,244\,X-6\,525.4$, $r=0.999\,8$, 线性范围 3.38~108.00 $\mu\text{g/mL}$, LOQ 为 1.01 $\mu\text{g/mL}$; 延胡索乙素 $Y=14\,647\,X-22\,996$, $r=0.999\,7$, 线性范围 4.09~131.00 $\mu\text{g/mL}$, LOQ 为 1.03 $\mu\text{g/mL}$; 洋川芎内酯 I $Y=63\,406\,X-232\,449$, $r=0.999\,8$, 线性范围 7.88~504.00 $\mu\text{g/mL}$, LOQ 为 1.10 $\mu\text{g/mL}$; 洋川芎内酯 H $Y=59\,449\,X-71\,058$, $r=0.999\,7$, 线性范围 3.69~118.00 $\mu\text{g/mL}$, LOQ 为 1.04 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.2.4 精密度试验 精密吸取中间质量浓度(阿魏酸、四氢非洲防己碱、延胡索乙素、洋川芎内酯 I、洋川芎内酯 H 质量浓度分别为 31.25、13.50、16.38、63.00、14.75 $\mu\text{g/mL}$)的混合对照品溶液, 连续进样 6 次, 记录各活性成分峰面积, 计算 RSD。阿魏酸、四氢非洲防己碱、延胡索乙素、洋川芎内酯 I、洋川芎内酯 H 峰面积 RSD 分别为 0.74%、0.34%、0.75%、0.61%、0.52%, 各成分 $\text{RSD} \leq 0.75\%$, 符合分析要求。

2.2.5 重复性试验 精密称取 XSD 50%乙醇洗脱部位干粉适量, 按“2.2.1”项方法制备供试品溶液并分析, 平行 6 份, 记录各活性成分峰面积, 计算各成分质量分数的 RSD。阿魏酸、四氢非洲防己碱、延胡索乙素、洋川芎内酯 I、洋川芎内酯 H 质量分

数的 RSD 分别为 0.26%、4.83%、2.04%、1.11%、1.35%，各成分 RSD $\leq$ 4.83%，符合分析要求。

2.2.6 稳定性试验 取同一供试品溶液(“2.2.1”项下配制的供试品溶液)，在 0、2、4、6、8、10、24 h 分别进样测定，记录各活性成分色谱峰的峰面积，计算 RSD。阿魏酸、四氢非洲防己碱、延胡索乙素、洋川芎内酯 I、洋川芎内酯 H 峰面积 RSD 分别为 0.63%、4.40%、1.10%、1.17%、0.32%，各成分 RSD $\leq$ 4.40%，符合分析要求。

2.2.7 加样回收率试验 取已测定的 XSD 活性部位粉末适量，加入所取样品中各活性成分质量 50%、100%、150% 的对照品，平行 3 份。按“2.2.1”项下色谱条件进样，记录各色谱峰面积，计算加样回收率及 RSD。各成分低、中、高质量浓度的加样回收率分别为阿魏酸(105.16 $\pm$ 4.64)%、(101.35 $\pm$ 1.54)%、(99.16 $\pm$ 3.55)%，四氢非洲防己碱(96.01 $\pm$ 5.68)%、(105.27 $\pm$ 8.85)%、(99.41 $\pm$ 0.24)%，延胡索乙素(104.25 $\pm$ 6.50)%、(102.64 $\pm$ 1.47)%、(94.85 $\pm$ 2.60)%，洋川芎内酯 I(102.10 $\pm$ 2.41)%、(101.09 $\pm$ 2.85)%、(97.54 $\pm$ 2.82)%，洋川芎内酯 H(104.06 $\pm$ 2.71)%、(98.45 $\pm$ 0.71)%、(103.56 $\pm$ 6.57)%，平均加样回收率 94.85%~105.27%，符合分析要求。各成分低、中、高质量浓度的加样回收率 RSD 分别为阿魏酸 4.80%、1.52%、3.58%，四氢非洲防己碱 5.91%、8.40%、0.24%，延胡索乙素 6.23%、1.43%、2.74%，洋川芎内酯 I 2.36%、2.82%、2.89%，洋川芎内酯 H 2.61%、0.72%、6.35%，RSD $\leq$ 8.40%，符合分析要求。

2.2.8 各活性成分定量测定结果 测得 XSD 活性部位中各活性成分阿魏酸、四氢非洲防己碱、延胡索乙素、洋川芎内酯 I、洋川芎内酯 H 质量分数分别为(1.89 $\pm$ 0.04)%、(0.87 $\pm$ 0.07)%、(1.74 $\pm$ 0.10)%、(4.57 $\pm$ 0.21)%、(0.58 $\pm$ 0.01)%($n=3$)。

2.3 CPLASM 的制备与性质考察

2.3.1 复合磷脂脂质体(CPL)的制备 采用薄膜分散法制备 CPL，小粒径脂质体磷脂组成为 EPC-胆固醇(77:23，质量比，下同)；大粒径脂质体磷脂组成为 EPC-HSPC-神经酰胺-胆固醇-胆固醇硫酸酯-棕榈酸(56.25:18.75:13.75:6.25:1.25:3.75)。称取各脂质适量溶于无水乙醇，减压旋蒸除去乙醇，用含 10%乙醇的磷酸盐缓冲溶液(PBS)水合，得到脂质体混悬液(脂质总质量浓度 60 mg/mL)。制备好的脂质体混悬液分别用高压均质机控制粒径在 200~300 nm(小粒径脂质体)或探头式超声仪控制粒径 >500 nm(大粒径脂质体)，并用马尔文纳米粒度仪测定 2 种脂质体的粒径分别为(258.00 $\pm$ 13.87)、(610.70 $\pm$ 37.40) nm($n=3$)。

2.3.2 CPLASM 的制备^[8-9] 尼龙膜与嵌套底部 150 $^{\circ}\text{C}$ 下加热 30 s，使其完全粘合，将嵌套置于 24 孔板中，向嵌套中加入小粒径脂质体 100 μL ，置于离心机中，在 25 $^{\circ}\text{C}$ 下 2 000 r/min 离心 10 min，将嵌套水平旋转 180 $^{\circ}$ 再加入小粒径脂质体 100 μL ，在 25 $^{\circ}\text{C}$ 下 2 000 r/min 离心 10 min，去除表面残留的脂质体混悬液；50 $^{\circ}\text{C}$ 加热干燥 45 min。干燥结束后，加入大粒径脂质体 100 μL ，2 000 r/min 离心 10 min。将嵌套置于烘箱(55 $^{\circ}\text{C}$) 2 h，待溶剂挥干后放入-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱冷冻 1 h，然后转移至真空干燥箱 30 $^{\circ}\text{C}$ 加热 2 h，冻融循环 2 次。将制备好的 CPLASM 置于-20 $^{\circ}\text{C}$ 储存。

2.3.3 CPLASM 电阻测定 将 CPLASM 用 PBS 预先水合 1 h(供给室 100 μL ，接收室 600 μL)，用 Millicell-ERS02 型细胞膜电阻测定仪测定电阻^[11]。CPLASM 的电阻值为(2 123 $\pm$ 282) $\Omega\cdot\text{cm}^2$ ($\bar{x}\pm s$ ， $n=3$)，接近猪耳皮电阻^[11]。制得的装置图如图 2 所示，加样后可以直接进行体外吸收实验。

2.3.4 傅里叶变换衰减全反射红外光谱(ATR-FTIR)

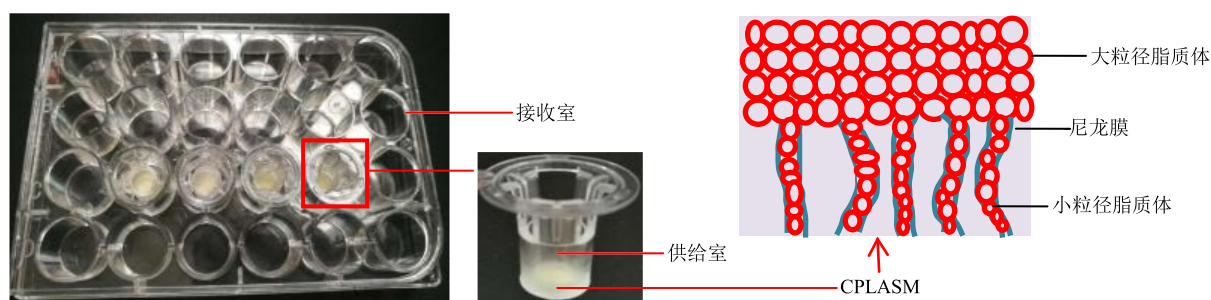


图 2 CPLASM 及其装置

Fig. 2 CPLASM and its device

测定 ATR-FTIR 参数设置, 扫描范围 4 000~1 000 cm^{-1} , 扫描次数 16 次, 分辨率 2 cm^{-1} , 内反射元件 (Internal reflectance element, IRE): 内反射元件材质硒化锌 (ZnSe), 入射角度 45°, 将 CPLASM 或猪耳皮置于 IRE 上进行红外光谱扫描。ATR-FTIR 测得 CPLASM CH_2 非对称振动峰波数为 $(2\,917.87 \pm 0.56) \text{cm}^{-1}$, CH_2 对称振动峰波数为 $(2\,850.69 \pm 0.97) \text{cm}^{-1}$ ($\bar{x} \pm s$, $n=3$), 猪耳皮 CH_2 非对称振动峰波数为 $(2\,917.29 \pm 0.10) \text{cm}^{-1}$, CH_2 对称振动峰波数为 $(2\,849.91 \pm 0.23) \text{cm}^{-1}$ ($\bar{x} \pm s$, $n=3$), 红外谱图见图 3。CPLASM 与猪耳皮脂质峰波数比较无统计学差异 ($P>0.05$)。

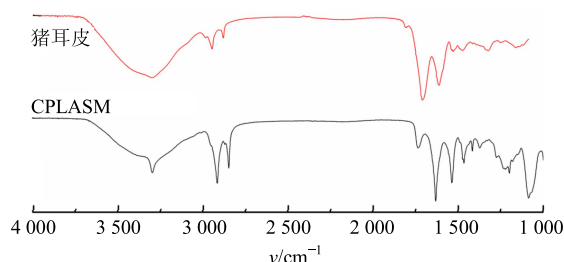


图 3 猪耳皮和 CPLASM 的 ATR-FTIR 谱图

Fig. 3 ATR-FTIR spectra of porcine ear skin and CPLASM

2.4 体外透皮吸收实验

2.4.1 猪耳皮制备 用刀片将猪耳背部毛剔除干净, 剥离猪耳背部皮肤, 除去皮下血管及组织, 于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存, 实验使用前将皮肤自然解冻。

2.4.2 供给液的制备 称取 XSD 活性部位粉末适量, 用 20%乙醇水溶液超声溶解, 得质量浓度为 10.14 mg/mL 的供给液。

2.4.3 接收液的制备 20%乙醇水溶液, 使用前 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预热并超声除去气泡。

2.4.4 体外透皮吸收实验 将猪耳皮固定于 Franz 扩散池上 (扩散面积为 3.14 cm^2 , 接收室体积为 8.3 mL), 角质层向上, 接收室加入接收液, 将装好皮肤与接收液的扩散池放入透皮扩散仪, 在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下 500 r/min 平衡 1 h。精密量取供给液 1.0 mL 于供给室, 分别于 8、12、16、20、24、36、48 h 吸取 0.2 mL 接收液, 及时补充等温空白接收液。

CPLASM 用 PBS 室温下预先水合 1 h (供给室加入 100 μL , 接收室 600 μL), 除去水合介质, 精密量取 100 μL 供给液于供给室, 接收室加入 600 μL 接收液 (图 2), 置于透皮扩散仪 ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$) 分别于 2、4、6、8、10、12 h 吸取 0.2 mL 接收液, 及时补充等温空白接收液。接收液样品 12 000 r/min 离心 10

min, 取上清液进行 HPLC 分析。

按公式 $Q = (V \times C_n + \sum V_s C_{n-1}) / A$ 求算不同时间单位面积的药物累积透过量 (Q); A 为有效透皮吸收面积 (cm^2), V 为接收室体积 (mL), V_s 为取样体积 (mL), C_n 为第 n 个取样点测得的接收液中药物质量浓度 ($\mu\text{g/mL}$), C_{n-1} 为第 $n-1$ 个取样点测得的接收液中药物质量浓度 ($\mu\text{g/mL}$)。以各时间点 Q 为纵坐标, 时间 (t) 为横坐标作图, 将曲线尾部直线部分数据进行线性回归, 得到 $Q-t$ 方程, 直线的斜率为稳态流量 [J_{ss} , $\mu\text{g}/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})$], 表观渗透系数 (P_{app}) = $J_{ss}/(3\,600 \cdot C_0)$, C_0 为供给液各成分初始质量浓度 ($\mu\text{g/mL}$)。不同时间点累积透过量 (T_n) = $AQ_n/Z_{总}$, Q_n 为第 n 个取样点测得的 Q , $Z_{总}$ 为供给室中加入总药量。结果见图 4 及表 1。可以看出, XSD 活性部位中 5 种活性成分在猪耳皮和 CPLASM 渗透排序基本一致, 应用 CPLASM 能够有效缩短体外透皮吸收试验所需要的时间。

将 5 种活性成分在猪耳皮和 CPLASM 的渗透参数进行相关分析 (图 5), 发现两者有良好的相关性 (P_{app} 相关性: $r=0.943\,4$; T_n 相关性: $r=0.950\,5$)。这说明, 尽管测得的参数绝对值不同, 但 CPLASM 区分 XSD 活性部位中不同性质活性成分体外透皮

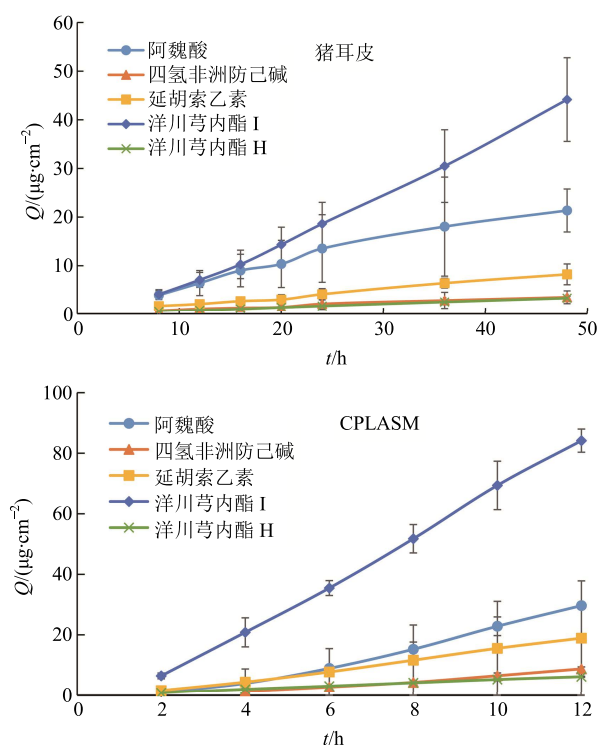


图 4 XSD 活性部位主要成分的体外透皮行为 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Fig. 4 Permeation behavior *in vitro* of active ingredients from active fraction of XSD ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

表 1 XSD 活性部位透过猪耳皮及 CPLASM 的渗透参数 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 1 Permeability parameters of active ingredients from active fraction of XSD through porcine ear skin and CPLASM ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

成分	$J_{ss}/(\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1})$		$P_{app}/(\times 10^{-6} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1})$		$T_n/\%$	
	猪耳皮	CPLASM	猪耳皮	CPLASM	猪耳皮 (48 h)	CPLASM (12 h)
阿魏酸	2.27 ± 1.46	6.31 ± 0.98	1.60 ± 1.02	4.96 ± 1.18	16.98 ± 3.51	24.78 ± 0.70
四氢非洲防己碱	0.33 ± 0.30	1.72 ± 0.28	0.78 ± 0.72	4.04 ± 0.07	9.33 ± 3.50	24.45 ± 1.85
延胡索乙素	0.64 ± 0.30	3.74 ± 0.62	0.96 ± 0.45	5.11 ± 0.40	14.14 ± 3.67	34.16 ± 2.17
洋川芎内酯 I	3.87 ± 0.93	16.19 ± 2.58	1.86 ± 0.45	7.76 ± 1.23	23.91 ± 4.66	47.89 ± 2.18
洋川芎内酯 H	0.30 ± 0.03	1.10 ± 0.17	2.81 ± 0.25	10.26 ± 1.55	35.12 ± 4.41	68.26 ± 1.74

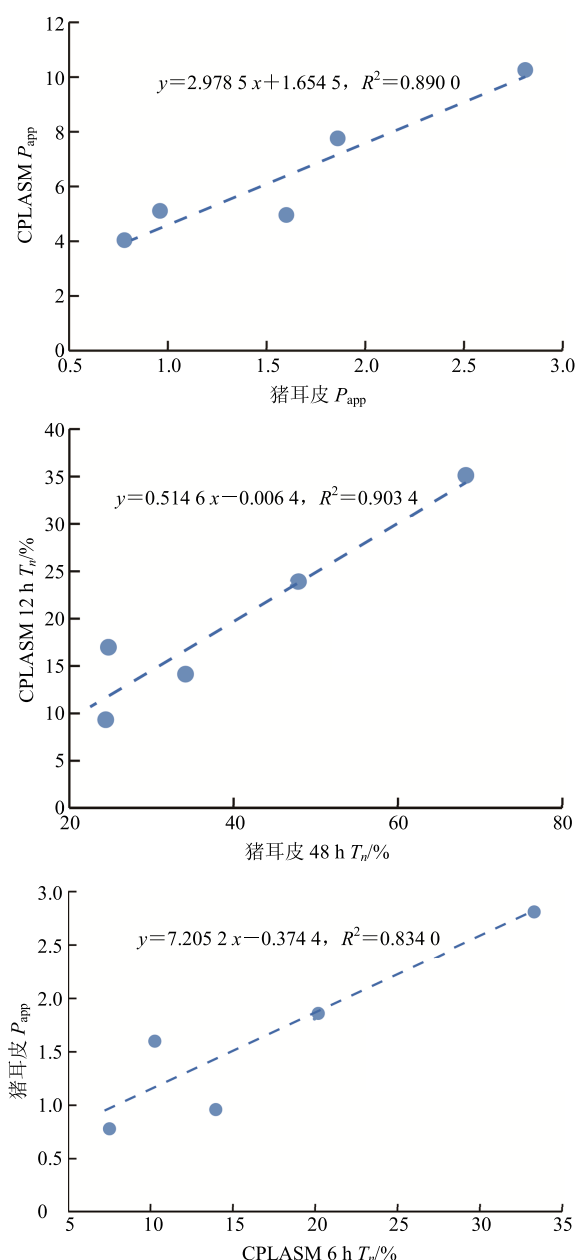


图 5 CPLASM 与猪耳皮测得的透皮参数相关性

Fig. 5 Correlation of permeability parameters between porcine ear skin and CPLASM

吸收行为的效果与猪耳皮是基本一致的。

将 XSD 活性部位中 5 种主要活性成分在 CPLASM 的各时间点的 T_n 与猪耳皮 P_{app} 建立相关性,发现 CPLASM 6 h 的 T_n 与猪耳皮 P_{app} 相关性较好 ($r=0.9132$)。提示由于体外透皮吸收大多是零级动力学过程,可以应用 CPLASM 测定某一时间点的 T_n 来评价活性成分透过能力,从而有效提高生物药剂学表征的效率,有望结合体外装置实现高通量表征。

2.5 油水分配系数的测定

2.5.1 制备水饱和的正辛醇溶液和正辛醇饱和的水溶液 将水中加入等量的正辛醇,置于具塞锥形瓶中,37℃恒温水浴振荡过夜。用分液漏斗分离正辛醇与水相,得到水饱和的正辛醇溶液和正辛醇饱和的水溶液。

2.5.2 活性部位中各成分油水分配系数的测定 精密称取 XSD 活性部位粉末适量,分别溶于水饱和的正辛醇溶液中。取 5.0 mL 该溶液并加入 5.0 mL 正辛醇饱和的水溶液,置于具塞锥形瓶中,37℃水浴振荡 12 h。取油相测活性成分质量浓度,取水相测定 pH 值,计算各活性成分油水分配系数。油水分配系数: $\log P = \log C_o / (C - C_o)$, C 为水饱和的正辛醇溶液中活性成分的初始质量浓度, C_o 为平衡后正辛醇相中活性成分的质量浓度。

测得 XSD 活性部位 (pH 5.5) 中阿魏酸、四氢非洲防己碱、延胡索乙素、洋川芎内酯 I、洋川芎内酯 H 的油水分配分别为 1.22 ± 0.28 、 0.67 ± 0.085 、 0.92 ± 0.11 、 1.04 ± 0.092 、 1.03 ± 0.093 ($n=3$)。

将活性成分的油水分配系数与其在猪耳皮的渗透参数建立相关性 (图 6),发现两者相关性不显著 (油水分配系数与表观渗透系数 P_{app} 相关性 $r=0.5644$)。说明在表征 XSD 经皮给药生物药剂学性质方面,通过测定油水分配系数与实际吸收行为有

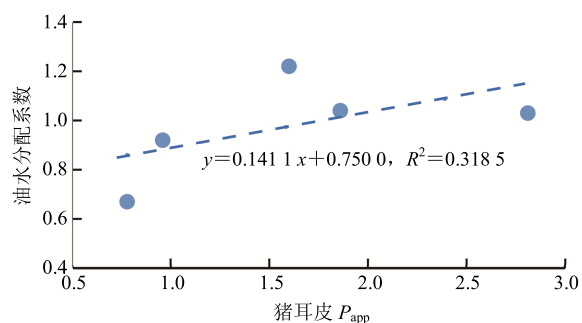


图6 油水分配系数与猪耳皮 P_{app} 相关性

Fig. 6 Correlation between oil-water partition coefficients and P_{app} values of porcine ear skin

一定的相关性，而采用 CPLASM 表征的结果则更加可靠。

3 讨论

LASM 是以尼龙膜为支架材料，小粒径脂质体用以填充尼龙膜内部膜孔，大粒径脂质体紧密排列在尼龙膜表面，从而构成具有一定屏障功能的角质层替代模型^[8,12]（图2）。复合磷脂技术是将2种不同相变温度的磷脂混合使用，有效调节脂质体的相变从而实现药剂学性质优化的一种制剂技术^[13-14]。汤清涵等^[9]通过调节 EPC 与 HSPC 的比例，确定了复合磷脂脂质体的最优比例为 EPC-HSPC（3:1），在该比例下制得的 CPLASM 的屏障功能最好 [电阻为 $(1\,988 \pm 311)\,\Omega \cdot \text{cm}^2$]，并且2种磷脂能够融合成均一相。本实验在此基础上加入角质层脂质，力图在组成上达到模拟真实皮肤的效果。电阻是评价 LASM 屏障功能的重要手段，电阻值越高，LASM 渗透性越低，膜屏障功能越好^[11]。优化后的 CPLASM 电阻为 $(2\,123 \pm 282)\,\Omega \cdot \text{cm}^2$ ，电阻提高，膜屏障功能增强，并且接近猪耳皮的电阻值^[11]。ATR-FTIR 是常用的表征皮肤角质层结构的方法，皮肤脂质峰主要有 CH_2 非对称振动峰（ $\sim 2\,918\,\text{cm}^{-1}$ ）和 CH_2 对称振动峰（ $\sim 2\,850\,\text{cm}^{-1}$ ）^[15]，比较了 CPLASM 与猪耳皮脂质峰波数，结果显示无统计学差异（ $P > 0.05$ ）。电阻测定和红外研究结果表明，CPLASM 在屏障功能和脂质结构上可以达到模拟猪耳皮的效果。

角质层是皮肤最主要的屏障，药物通过角质层的途径有细胞间途径和细胞内途径。此前的研究已经表明，由于 LASM 不含角蛋白，也就缺乏水性通道，因此对于主要通过细胞内途径吸收的极性药物而言透过性偏低^[8]。本实验中选择的是脂溶性活性部位，主要活性成分也都是非极性成分，研究结果

表明 CPLASM 测得的参数与猪耳皮基本平行，因此有望能够替代动物皮肤应用于体外透皮吸收研究。必须指出的是，能够透皮吸收产生疗效的一般都是脂溶性活性成分。随着时代的发展和社会的进步，动物实验替代已经成为大势所趋，与动物皮肤相比，人工皮肤膜具有质量可控、能够大量制备等优势^[7]，有望成为未来体外透皮吸收评价的主流。进一步的研究已经发现，LASM 还能够有效应用于中药制剂中透皮吸收促进剂的评价^[16]。

吸收性质的评价目前主要是通过活性成分的相关参数如油水分配系数进行预测的，但是中药活性部位组分复杂，相互影响，如能直接测得其透皮吸收参数，则能更有效地表征其体外透皮吸收的生物药剂学性质。因此，本实验应用 CPLASM 测定某一参数来预测表征 XSD 活性部位的生物药剂学性质，实验结果表明相对于传统的测定理化参数预测药物透皮能力的方法可能更具说服力。CPLASM 能够大量制备，具有高通量表征的优势，有望为中药经皮给药制剂的设计提供一定的科学依据。

参考文献

- [1] 张会, 张黄琴, 蒋秋冬, 等. 香附四物汤效应部位体外透皮吸收性质的研究 [J]. 中草药, 2015, 46(20): 3017-3022.
- [2] 董其虎. 香附四物汤治疗气滞血瘀型原发性痛经的临床疗效评价及作用机制初探 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2012.
- [3] 李炜. 香附四物汤用于气滞血瘀证原发性痛经大鼠体内过程研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2013.
- [4] 刘培. 四物汤类方用于妇科血瘀证原发性痛经的物质基础与配伍规律研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2011.
- [5] 李振皓, 刘培, 钱大玮, 等. 主成分分析用于香附四物汤效应部位体外经皮渗透的研究 [J]. 药学学报, 2013, 48(6): 933-939.
- [6] 潘瑛, 李振皓, 钱大玮, 等. 不同促渗剂对香附四物汤外用贴剂中效应成分体内药动学的影响 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(2): 294-302.
- [7] 张会, 陈军, 蒋秋冬, 等. 脂质人工皮肤膜的研究进展 [J]. 中国药学杂志, 2016, 51(10): 780-785.
- [8] Zhang H, Zhu X, Shen J, et al. Characterization of a liposome-based artificial skin membrane for *in vitro* permeation studies using Franz diffusion cell device [J]. *J Liposome Res*, 2016, 27(4): 302-311.
- [9] 汤清涵, 张会, 沈菁菁, 等. 复合磷脂组成对香附四物汤活性成分透过脂质体人工皮肤膜行为的影响 [J].

- 南京中医药大学学报, 2017, 33(4): 371-375.
- [10] 姜 雯, 曾 诚, 于 宁, 等. 星点设计-效应面法优化天山雪莲提取物复合磷脂脂质体制备工艺 [J]. 中草药, 2016, 47(1): 57-64.
- [11] Engesland A, Škalko-basnet N, Flaten G E. *In vitro* models to estimate drug penetration through the compromised stratum corneum barrier [J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2016, 42(11): 1742-1751.
- [12] Flaten G E, Bunjes H, Luthman K, *et al.* Drug permeability across a phospholipid vesicle-based barrier 2. Characterization of barrier structure, storage stability and stability towards pH changes [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2006, 28(4): 336-343.
- [13] 陈 军, 张 婷, 蔡宝昌, 等. 马钱子总生物碱复合磷脂脂质体的药剂学性质研究 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35(1): 32-36.
- [14] Chen J, Cheng D, Li J, *et al.* Influence of lipid composition on the phase transition temperature of liposomes composed of both DPPC and HSPC [J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2013, 39(2): 197-204.
- [15] Lan Y, Wang J, Li H, *et al.* Effect of menthone and related compounds on skin permeation of drugs with different lipophilicity and molecular organization of stratum corneum lipids [J]. *Pharm Dev Technol*, 2016, 21(4): 389-398.
- [16] Ma M, Di H J, Zhang H, *et al.* Development of phospholipid vesicle-based permeation assay models capable of evaluating percutaneous penetration enhancing effect [J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2017, 43(12): 2055-2063.