

促渗剂对祛风活络喷雾剂体外经皮渗透效果的影响

张新林, 邱琼华, 李隽永, 陶晓静, 张蓓, 郑厚平, 毛桂福*

柳州市中医医院 (柳州市壮医医院), 广西 柳州 545001

摘要: 目的 筛选适宜祛风活络喷雾剂的促渗剂。方法 采用垂直式改良 Franz 扩散池考察 1%、2%、3% 的氮酮、薄荷脑、冰片 3 种促渗剂对祛风活络喷雾剂中岩白菜素的体外经皮促透作用。结果 岩白菜素累积透过量随着促渗剂浓度的增加而增加, 透皮行为均符合零级方程, 在高浓度条件下, 薄荷脑的促透效果最优。结论 3% 薄荷脑对祛风活络喷雾剂中岩白菜素促透效果优于同浓度的冰片和氮酮。

关键词: 祛风活络喷雾剂; 岩白菜素; 促渗剂; 氮酮; 薄荷脑; 冰片; 促透作用

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2022)12-2729-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2022.12.008

Influence of penetration enhancers on percutaneous penetration of Qufeng Huoluo Spray *in vitro*

ZHANG Xin-lin, QIU Qiong-hua, LI Juan-yong, TAO Xiao-jing, ZHANG Bei, ZHENG Hou-ping, MAO Gui-fu
Liuzhou Traditional Chinese Medical Hospital (Liujcough Si Ywcuengh YihYen), Liuzhou 545001, China

Abstract: Objective To screen suitable penetration enhancer for Qufeng Huoluo Spray. **Methods** Percutaneous permeation-enhancing effects *in vitro* of berberin in Qufeng Huoluo Spray with three permeation enhancers at different concentrations of 1%, 2%, and 3% were investigated on vertical modified Franz diffusion cell. **Results** The cumulative permeation amount of berberin increased with the increase of the concentration of the permeation enhancers, and the permeation behaviors conformed to the Zero-order equation. Under the condition of high concentration, the permeation-enhancing effect of menthol was the best. **Conclusion** The penetration enhancement effects of 3% menthol on berberin in Qufeng Huoluo Spray were better than those in borneol and azone at the same concentration.

Key words: Qufeng Huoluo Spray; berberin; penetration enhancer; azone; menthol; borneol; permeation-enhancing effect

祛风活络喷雾剂是由黄锁梅根、四方藤、铁包金、杜仲、黑老虎、五指毛桃等壮瑶药组方而成的外用制剂, 具有通经活络、消肿止痛等功效。该处方在柳州市中医医院使用多年, 拟开发为喷雾剂, 达到携带方便, 给药准确的目的。促渗剂是影响外用药物中有效成分吸收的重要因素之一^[1-2], 因此筛选有效的促渗剂并确定其在处方中的比例对充分发挥药物疗效具有重要意义。四方藤是祛风活络喷雾剂中主要药味, 收载于《广西壮药质量标准 (第二卷)》, 具有祛风除湿、活血通络的功效, 其有效成分为岩白菜素。本实验以岩白菜素的累积渗透量、渗透速率为指标, 考察氮酮、薄荷脑、冰片 3 种促渗剂, 为祛风活

络喷雾剂的研究开发提供依据。

1 材料

安捷伦 1260 高效液相色谱仪; SQP 电子分析天平 (赛多利斯科学仪器有限公司); KQ-800DE 超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); GWB-1 超纯水机 (北京普析通用仪器有限责任公司); TP-6 智能透皮实验仪 (天津市鑫洲科技有限公司)。

岩白菜素对照品 (成都曼思特生物科技有限公司, 质量分数 99.65%, 批号 MUST-21060907), 薄荷脑 (黄山天目薄荷药业有限公司, 规格 250 g/瓶, 批号 20210421), 冰片 (安徽省铜陵冰片厂, 规格 1 000 g/袋, 批号 210401), 月桂氮草酮 (湖北科捷

收稿日期: 2022-07-11

基金项目: 柳州市科技计划项目 (2018BE10501)

作者简介: 张新林, 男, 初级药师, 研究方向为中药民族药新制剂。E-mail: 312363931@qq.com

*通信作者: 毛桂福, 男, 主任药师, 从事中药民族药新制剂研究。E-mail: maogf2005@sina.com

制药有限公司, 规格 500 g/瓶, 批号 200701), 乙腈为色谱纯(弗顿), 其他试剂均为分析纯。祛风活络喷雾剂(柳州市中医医院制剂室制备, 规格 100 mL/瓶, 批号 20220201)。

SPF 级昆明小鼠 30 只, 体质量 (20 ± 2) g, 许可证号 SCXK(湘)2019-0015, 长沙市天勤生物技术有限公司提供, 在符合清洁标准的实验室喂养, 温度 $22 \sim 25$ °C, 湿度 50%~70%。

2 方法与结果

2.1 岩白菜素的 HPLC 法测定

2.1.1 对照品溶液的配制 精密称取岩白菜素适量, 加 50% 甲醇溶解并稀释, 制成 51.070 6 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品储备液。取对照品储备液 1 mL, 置 25 mL 量瓶中, 加 50% 甲醇稀释至刻度, 得 2.04 $\mu\text{g/mL}$ 对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液的制备 祛风活络喷雾剂样品透皮试验中取不同时间点接收液 10 mL, 置于蒸发皿中, 用磷酸调节 pH 值至 4~5, 水浴蒸干后立即冷却, 加入 50% 甲醇溶解并定容至 2 mL, 摇匀, 用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

2.1.3 色谱条件 Diamonsil C₁₈ 色谱柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.2% 磷酸水(10:90); 检测波长为 212 nm; 体积流量为 1 mL/min; 柱温为 30 °C; 进样量 10 μL 。

2.1.4 线性关系考察 精密吸取岩白菜素储备液适量, 加入 50% 甲醇稀释成质量浓度分别为 0.510 7、1.021 4、2.042 8、3.064 2、4.085 6、5.107 1、12.517 6、25.035 3 $\mu\text{g/mL}$ 的系列对照品溶液, 进样测定。以质量浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线, 结果回归方程为 $Y=44.0X+3.65$, $r=0.9999$, 岩白菜素在 0.510 7~25.035 3 $\mu\text{g/mL}$ 存在良好的线性关系。按信噪比 $(S/N)=10$ 计算定量限, 定量限为 0.120 $\mu\text{g/mL}$; 按 $S/N=3$ 计算检测限, 检测限为 0.036 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.1.5 精密度试验 取岩白菜素对照品溶液 10 μL , 连续进样 6 次, 结果以岩白菜素峰面积计算的 RSD 值为 1.50%。

2.1.6 重复性试验 取 6 份含岩白菜素 50% 甲醇溶液分别进样, 测定岩白菜素的质量浓度, 结果其 RSD 值为 1.27%。

2.1.7 稳定性试验 取同一含岩白菜素 50% 甲醇溶液 10 μL , 在室温下 0、2、4、6、8、12 h 进样,

结果以岩白菜素峰面积计算其 RSD 值为 0.96%, 说明岩白菜素 50% 甲醇溶液在室温下 12 h 内稳定性良好。

2.1.8 空白回收试验 取空白接收液共 6 份, 每份加入 2.042 8 $\mu\text{g/mL}$ 岩白菜素对照品溶液 2 mL, 用磷酸调节 pH 值至 4~5, 水浴蒸干, 用 50% 甲醇溶解并定容至 2 mL, 进样测定, 计算岩白菜素回收率, 结果平均回收率为 99.06%, RSD 值为 1.57%。

2.1.9 测定方法 采用外标法计算透皮试验中接收液中岩白菜素的质量浓度。

2.2 不同促渗剂的透皮吸收效果

取 30 只昆明小鼠, 适应性喂养 7 d 后, 提前 12 h 禁食禁水, 脱毛后处死, 立即剪下皮肤, 小心剥离脂肪, 选取完整皮肤, 用生理盐水冲洗干净, -20 °C 保存备用, 1 周内使用。选择冰片、薄荷脑、氮酮(水溶性)作为促渗剂, 分别配制质量浓度 1%、2%、3% 的含促渗剂的祛风活络喷雾剂溶液, 备用。取 6 块鼠皮, 分别编号 1~6, 使用垂直式改良 Franz 扩散池。该装置由上下 2 只筒状玻璃管对合而成, 扩散池容积为 13.5 mL, 有效扩散面积为 1.43 cm^2 , 恒温水浴加热, 温度控制在 (37.5 ± 0.2) °C, 接收液为 30% 乙醇-PBS 缓冲液, 内加搅拌子。

将已处理好的鼠皮固定在两室之间, 角质层面向扩散池一侧, 加入对应接收液, 用保鲜膜封口, 避免药液挥发, 排除接受池内的气泡, 先用 30% 乙醇-PBS 缓冲液预平衡 60 min, 再向扩散池内加入祛风活络喷雾剂溶液对照或含促渗剂的祛风活络喷雾剂溶液, 启动透皮扩散试验仪, 转速为 300 r/min。于 2、4、6、8、10 h 将接收液全部取出, 并立即补加同体积新鲜接收液。接收液制备供试品溶液, 进样测定岩白菜素的峰面积值, 通过回归方程计算岩白菜素的质量浓度, 计算单位面积累积透过量 (Q) 和单位面积累积透过率 (P)。

$$Q = (\sum_{i=1}^n C_n) \times V/SS$$

$$P = Q \times 100/T$$

式中 C_n 表示第 n 次取样时接收液中岩白菜素的质量浓度, V 表示取样体积, S 表示有效扩散面积, T 表示药液中岩白菜素的质量浓度

使用 Origin 9.0 以岩白菜素的单位面积平均累积透过量对时间作图, 得不同浓度、不同种类促渗剂冰片、薄荷脑、氮酮对岩白菜素的 10 h 累积透透量, 见图 1。

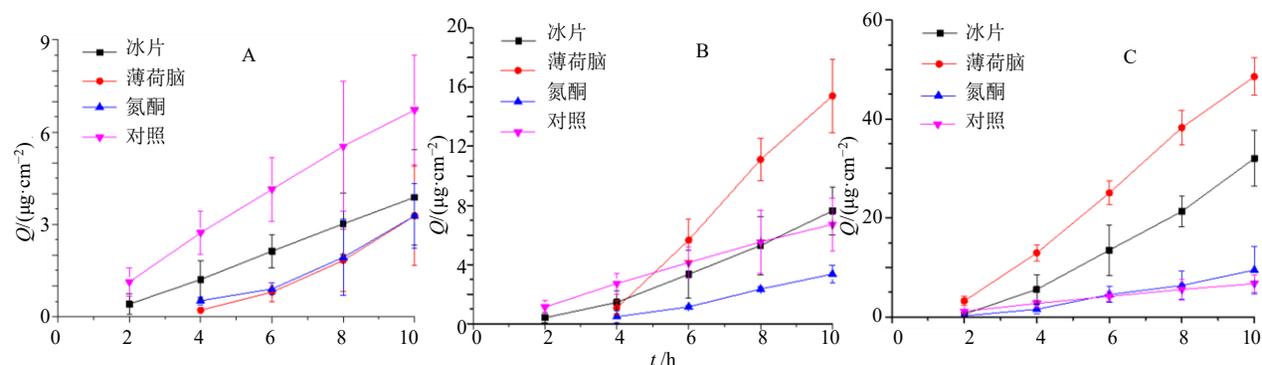


图 1 1% (A)、2% (B)、3% (C) 促渗剂对岩白菜素促透的影响

Fig. 1 Effects of 1% (A), 2% (B), and 3% (C) penetration enhancers on penetration enhancement of bergenin

结果显示,与对照组相比,在1%浓度条件下,各种类促渗剂会不同程度地减少岩白菜素的累积渗透量。在2%浓度条件下,含薄荷脑组在6h后岩白菜素累积渗透量有明显增加,与对照组相比有统计学差异($P<0.05$)。在3%浓度下,含冰片组和含薄荷脑组的岩白菜素累积渗透量均有明显增加,与对照组相比有统计学差异($P<0.05$)。在10h测定点时,含3%薄荷脑的祛风活络喷雾剂中岩白菜素累积渗透量达到最大(48.56 ± 3.81) $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。

取曲线中的直线部分进行线性回归分析,结果

见表1。各组累积渗透量与时间呈现良好线性关系,符合零级方程, r 值均大于0.97。同时每组内的稳态渗透速率和单位面积累积透过率也会随着促渗剂浓度的增加而增长。在浓度为1%的促渗剂条件下,冰片稳态渗透速率大于薄荷脑和氮酮;在浓度为2%、3%的促渗剂条件下,稳态渗透速率分别是薄荷脑>冰片>氮酮。含1%冰片、1%薄荷脑、1%氮酮组和2%氮酮组的稳态渗透速率小于对照组。在相同浓度下,含3%薄荷脑的样品的稳态渗透速率和单位面积累积透过率最大。

表 1 不同促渗剂对岩白菜素的吸收作用参数

Table 1 Absorption parameters of bergenin with different penetration enhancers

促渗剂	浓度	拟合方程	稳态渗透速率/ ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$)	单位面积累积 透过率/%	皮肤中药物残 留量/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)
对照	—	$Y=1.399X-0.145$ ($r=0.9986$)	1.399	3.65	6.95 ± 1.09
冰片	1%	$Y=0.875X-1.370$ ($r=0.9998$)	0.875	2.11	$15.92\pm 5.90^*$
	2%	$Y=1.831X-3.694$ ($r=0.9920$)	1.831	4.15	$39.12\pm 3.82^*$
	3%	$Y=7.869X-16.882$ ($r=0.9921$)	7.869	17.39	$48.39\pm 7.70^*$
薄荷脑	1%	$Y=1.024X-3.078$ ($r=0.9827$)	1.024	1.78	$22.71\pm 5.96^*$
	2%	$Y=4.847X-13.499$ ($r=0.9990$)	4.847	8.36	$37.31\pm 4.88^*$
	3%	$Y=11.601X-20.796$ ($r=0.9987$)	11.601	26.35	$73.73\pm 3.52^*$
氮酮	1%	$Y=0.931X-2.532$ ($r=0.9733$)	0.931	1.78	$30.86\pm 2.99^*$
	2%	$Y=0.987X-2.604$ ($r=0.9887$)	0.987	1.83	$21.19\pm 7.68^*$
	3%	$Y=2.337X-4.938$ ($r=0.9923$)	2.337	5.13	$33.41\pm 0.65^*$

与对照组比较: * $P<0.05$

* $P<0.05$ vs control group

2.3 皮肤中药物残留量考察

体外透皮实验结束后,立即清除供给池中药物,用清水将皮肤表面药物残渣冲洗干净,剪下渗透试验中与扩散池接触的部分,称定质量,剪成碎片,转移至组织研磨器中,加入适量50%甲醇研磨

3 min,收集组织匀浆液共8 mL,超声处理30 min,滤过,滤液加入磷酸调节pH值至4~5,水浴蒸干,立即冷却后加入50%甲醇溶解并定容至2 mL,0.45 μm 微孔滤膜滤过后,进样10 μL ,采用HPLC法测定岩白菜素的质量浓度,计算皮肤中药物残留量,

结果见表 1。各促渗剂组皮肤中药物残留量均大于对照组, 差异具有显著性 ($P < 0.05$)。不同浓度的促渗剂与对照组相比, 均会增加皮肤中岩白菜素的残留量, 并且也会随着促渗剂浓度的增加而增加, 在促渗剂比例较低时, 皮肤的“贮库效应”则会更加明显。

3 讨论

3.1 促渗剂、接收液的选择

氮酮、冰片、薄荷脑均为目前市面上常用促渗剂, 通过作用于细胞内脂质, 改变脂质分子的排列和增加其流动性, 或促使表层细胞间裂隙扩大, 减小扩散阻力, 从而增加药物的透皮吸收^[3-4]。同时冰片、薄荷脑本身具有良好的清凉止痒、消炎镇痛的功效, 能更好地与祛风活络喷雾剂配伍^[5-6]。促透实验结果显示, 促透效果随着促渗剂比例的增加而增加, 在高浓度条件下, 薄荷脑明显优于冰片和氮酮, 同时低、中浓度促渗剂还会导致岩白菜素产生“时滞效应”, 皮肤中残留量显著增加。

此外, 体外促渗实验的接收液应在满足漏槽条件下最大限度地接近人的体液环境^[7]。实验前期考察了不同乙醇比例的 PBS 溶液和 0.9%氯化钠溶液对指标成分的影响, 结果发现随着乙醇比例的增加, 岩白菜素的溶解也会相应增大, 但考虑到过高比例的乙醇同时也会破坏角质层结构^[8-9], 而且在实验过程中随着乙醇的挥发, 导致接受池内接收液不稳定, 接受池容易出现气泡, 故结合文献和预实验结果, 最终选择 30%乙醇 - PBS 溶液作为接收液。

3.2 接收液中岩白菜素的测定

祛风活络喷雾剂中含乙醇, 药物在皮肤的停留时间较短, 故促渗选择观察 10 h。岩白菜素分子式为 $C_{14}H_{16}O_9$, 属于异香豆精类化合物, 容易在中性

和碱性条件下发生降解^[10-11], 而 PBS 缓冲液的 pH 值为 7.4, 样品加热浓缩后岩白菜素将进一步降解。本实验加入磷酸调节样品 pH 值至 4~5, 抑制其在 PBS 缓冲液中的水解, 该方法下岩白菜素的回收率满足要求, 且重现性好。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 闫治攀. 基于统计分析法探讨透皮促渗剂的应用研究现状 [J]. 西部中医药, 2020, 33(7): 152-160.
- [2] 宗时宇, 刘洋, 王春柳, 等. 透皮贴剂在中药研究中的应用及发展现状 [J]. 中国药师, 2022, 25(3): 510-514.
- [3] 张荣发, 杨宗发, 江尚飞. 薄荷油的药理毒理作用研究进展 [J]. 中国药业, 2012, 21(19): 1-3.
- [4] 郭源源. 薄荷醇的促透皮吸收作用及其对角质形成细胞的影响 [D]. 湛江: 广东医学院, 2007.
- [5] 李倩, 高瑜, 邹佳, 等. 中药透皮吸收促进剂的研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2022, 33(1): 189-193.
- [6] 尚坤, 李敬文, 常美月, 等. 中药冰片药理作用研究进展 [J]. 吉林中医药, 2018, 38(4): 439-441.
- [7] 张宁. 补骨脂素和异补骨脂素体外透皮特性研究 [J]. 中成药, 2002, 24(1): 7-9.
- [8] 兰颐, 王琼, 安静, 等. 接受液中的乙醇浓度对药物体外透皮试验的影响 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(16): 2597-2600.
- [9] 阿卜力克木·奥不力, 迪丽阿热姆·尼加提, 马庆苓, 等. 不同乙醇浓度的复方司亚丹酊体外透皮实验及其对皮肤组织结构的影响 [J]. 中国新药杂志, 2019, 28(11): 1366-1371.
- [10] 池翠云, 王锋, 雷婷, 等. 瑶药四方藤化学成分研究 [J]. 中药材, 2010, 33(10): 1566-1568.
- [11] 李凤, 周丹, 秦瑄, 等. 岩白菜素理化性质的研究 [J]. 中国药学杂志, 2009, 44(2): 92-95.

[责任编辑 解学星]