

天麻苷元体外透皮特性与皮肤刺激性研究

蔡 铮, 黄 娟, 吴 越, 龚 耘, 刘中秋

南方医科大学药学院, 广东 广州 510515

摘 要: **目的** 考察天麻苷元的透皮特性与皮肤刺激性, 为其经皮给药制剂的开发提供依据。**方法** 选取离体大鼠皮肤, 采用改良 Franz 扩散池法对天麻苷元的透皮性能进行评价, 并进一步考察常用溶剂、促透剂以及透皮微粒载体对其透皮性的影响。此外, 选择家兔为动物模型, 评价天麻苷元溶液剂与凝胶剂的皮肤刺激性。**结果** 天麻苷元较易透皮, 经大鼠腹部皮肤的渗透速率常数 (J_s) 可达 $134.1 \mu\text{g}/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})$, 24 h 透过量约为 $3 \text{ mg}/\text{cm}^2$ 。30%乙醇对天麻苷元兼具增溶与促透作用, 是较理想的溶剂。常用促透剂氮酮、松节油、冰片以及透皮微粒载体微乳与醇质体对天麻苷元透皮性能的改善作用并不显著。家兔皮肤刺激性试验结果表明天麻苷元溶液剂与凝胶剂均无明显的皮肤刺激性。**结论** 天麻苷元具有良好的透皮性能, 且无皮肤刺激性, 适合开发成经皮给药制剂, 应用于中枢神经系统疾病的治疗。

关键词: 天麻苷元; 经皮给药; 透皮性; 渗透速率常数; 皮肤刺激性

中图分类号: R286.02

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2011)02-0266-05

In vitro percutaneous permeability and skin irritation of gastrodigenin

CAI Zheng, HUANG Juan, WU Yue, GONG Yun, LIU Zhong-qiu

School of Pharmaceutical Sciences, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: **Objective** To investigate percutaneous permeability and skin irritation of gastrodigenin so as to provide the basis on the development of transdermal drug delivery formulations. **Methods** The modified Franz diffusion cell method and the excised rat skin were used to evaluate the percutaneous permeability of gastrodigenin. The effects of various common-used solvents, transdermal enhancers, and particle carriers on the permeability of gastrodigenin were studied. The rabbit skin irritation test was used to evaluate the safety of gastrodigenin solutions and their gels. **Results** Gastrodigenin was easy to permeate rat abdominal skin. The penetration rate constant (J_s) was $134.1 \mu\text{g}/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})$, and transit dose accumulated in 24 h was $3 \text{ mg}/\text{cm}^2$. The solubility and permeability of gastrodigenin could be enhanced by 30% EtOH, so it was an ideal solvent for gastrodigenin. Improvement effects of the transdermal enhancers (Azone, turpentine, and borneol) and the transdermal particle carriers (microemulsion and ethosomes) were not significant. The skin irritation test results indicated that neither gastrodigenin solutions nor their gels exerted irritative effects to the rabbit skin. **Conclusion** Gastrodigenin has good percutaneous permeability without skin irritation, so it is suitable for the transdermal drug delivery in the treatment of central nervous system diseases.

Key words: gastrodigenin; transdermal drug delivery; percutaneous permeability; penetration rate constant; skin irritation

天麻苷元 (gastrodigenin) 是天麻素 (gastrodin) 的苷元, 化学名为对羟基苯甲醇, 二者皆为天麻的主要活性成分^[1-2]。由于化学结构的差异, 二者的溶解性能有所不同: 天麻素易溶于水^[3], 天麻苷元水溶性稍弱, 呈脂水两亲性^[2,4]。天麻素与天麻苷元具有镇静、镇痛、抗惊厥等中枢抑制作用, 二者药效相近, 且毒性均较小^[5-8]。目前天麻素已在临床上被

广泛应用于眩晕、头痛、神经衰弱等疾病的治疗, 剂型包括注射剂、片剂与胶囊剂^[9]。中枢神经系统疾病的特点是患者精神压力较大, 且一般病程较长, 往往需要多次给药。众所周知, 经皮给药具有延长作用时间, 减少给药频率, 改善患者用药顺应性的优点, 但要求药物具有足够的透皮能力。天麻苷元的理化性质: 小相对分子质量(124.14)、低熔点(155

收稿日期: 2010-08-21

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30902009)

作者简介: 蔡 铮 (1977—), 男, 江西吉安人, 博士, 讲师, 研究方向为新型给药系统的研发

Tel: (020)61648597 E-mail: caizheng2002@sina.com

*通讯作者 刘中秋 Tel: (020)61648596 E-mail: liuzq@smu.edu.cn

℃)、脂水两亲性,使其有可能成为一个理想的经皮给药候选药物。因此,本实验对天麻苷元的透皮特性与皮肤刺激性进行考察,为其经皮给药制剂的开发提供依据。

1 仪器与材料

UPLC 超高效液相色谱仪(美国 Waters 公司); YB—P6 智能透皮试验仪(天津市富兰斯电子科贸有限公司); 5424 型离心机(德国 Eppendorf 公司); XL2000 型超声波细胞破碎仪(美国 Misonix 公司); BT21S 型电子分析天平(瑞士 Mettler-Tolepo 公司)。

天麻苷元(仪征市鼎信化工有限公司,质量分数为 99.8%);卡波姆 941(美国诺誉公司);乙腈、甲醇为色谱纯,水为超纯水,其余试剂均为分析纯。

SD 大鼠,雄性,体质量 200~250 g;新西兰白兔,雌雄兼用,体质量 2.0~2.5 kg,均由南方医科大学实验动物中心提供,合格证号 SCXK(粤)2006-0015。

2 方法与结果

2.1 透皮试验方法的建立

2.1.1 离体皮肤处理方法 取 SD 大鼠,断颈处死,剃毛,取腹部或背部皮肤,小心剔除皮下脂肪和结缔组织及肌肉层,用生理盐水冲洗干净,于-20℃冷冻保存,备用。实验前需检查鼠皮,不得有任何损伤。

2.1.2 透皮扩散试验方法 采用改良的 Franz 扩散池进行试验。将处理好的皮肤固定于扩散池接口处,角质层面向供给池。有效扩散面积为 1.77 cm²,生理盐水为接收液,接收池容量为 17.5 mL,搅拌转速为 200 r/min,水浴温度为(37±0.2)℃。向供给池内加入 1 mL 供试品溶液后开始计时,分别于 1、2、4、6、8、10、12、21、24 h 从接受池中取样 200 μL,同时补加等体积等温生理盐水。样品适当稀释后采用 UPLC 法测定天麻苷元的质量浓度,并计算单位面积的累计透过量。

$$Q_n = \frac{C_n \times V_0 + \sum_{i=1}^{n-1} (C_i \times V_i)}{A}$$

式中 Q_n 为 t 时间单位面积累积透过量, C_n 为 t 时间质量浓度的测量值, C_i 为 t 时间以前质量浓度的测量值, V_0 为接受液的总体积, V_i 为每次取样的体积, A 为扩散池面积

以 Q_n 对渗透时间 t 进行线性回归,所得直线斜率即为稳态渗透速率常数(J_s),直线截距为滞后时间 t_{lag} ,渗透系数(P)= J_s/C_d (C_d 为供试品溶液中

药物的质量浓度)。

2.2 接收液中天麻苷元的 UPLC 法测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 BEH C₁₈(50 mm×2.1 mm, 1.7 μm);流动相为乙腈-水(2.5:97.5);柱温 40℃;体积流量 0.4 mL/min;检测波长 221 nm;进样量 10 μL。该色谱条件下天麻苷元对照品、空白皮肤透过液以及供试样品的色谱图见图 1,接收液中的杂质未干扰样品的测定,分离度与峰型均较好,分析时间不超过 2 min。

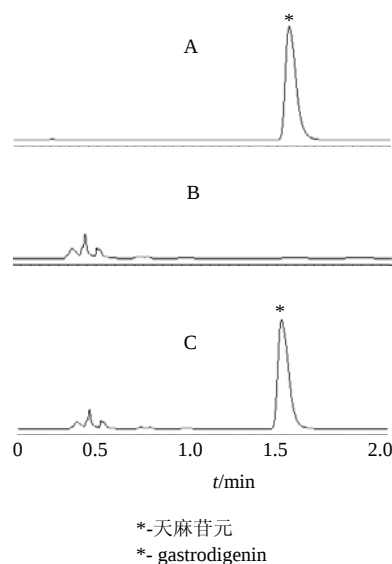


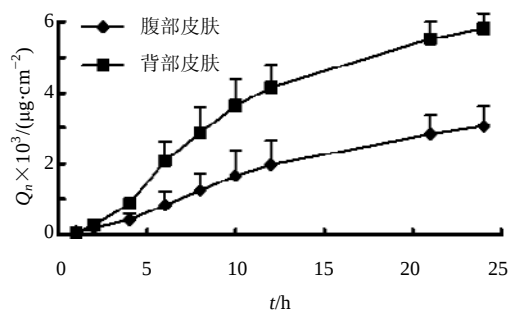
图 1 天麻苷元对照品(A)、空白样品(B)和样品(C)的色谱图

Fig. 1 Chromatograms of gastrodigenin reference substance (A), blank sample (B), and sample (C)

2.2.2 测定方法 采用峰面积定量法测得样品标准曲线为 $Y=76\,293.61X-8\,933.24$ ($r=0.999\,9$),线性范围:0.5~50 μg/mL。0.5、5.0、50 μg/mL 天麻苷元的日内精密度分别为 0.54%、1.75%、1.91% ($n=5$),日间精密度分别为 0.72%、2.76%、1.45% ($n=5$),回收率分别为 100.7%、96.8%、99.0% ($n=5$)。

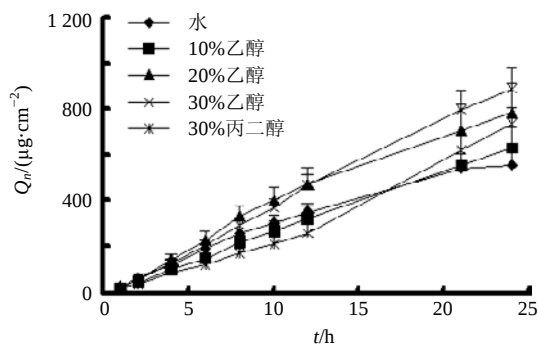
2.3 天麻苷元透皮特性的研究

2.3.1 天麻苷元饱和水溶液透皮性考察 以天麻苷元饱和水溶液(质量浓度为 33.15 mg/mL)为供试品溶液,采用上述透皮扩散试验法,考察天麻苷元在大鼠腹部与背部皮肤中的经皮渗透性。结果见图 2、表 1。可见天麻苷元的透皮速率较快,与其理化性质相吻合。背部皮肤渗透系数是腹部皮肤的 2 倍。为便于与同类文献比较,后续实验选择较常用的大鼠腹部皮肤进行体外透皮试验。

图2 天麻苷元饱和水溶液累积渗透曲线 ($n=5$)Fig. 2 Cumulative penetration curves of saturated solution of gastrodigenin ($n=5$)表1 天麻苷元饱和水溶液的渗透参数 ($n=5$)Table 1 Permeation parameters of saturated solution of gastrodigenin ($n=5$)

部位	$J_s/(\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1})$	$P\times 10^3/(\text{cm}\cdot\text{h}^{-1})$	t_{lag}/h
腹部	134.1 ± 20.6	4.04 ± 0.62	1.02 ± 0.38
背部	256.8 ± 17.4	7.74 ± 0.52	0.28 ± 0.21

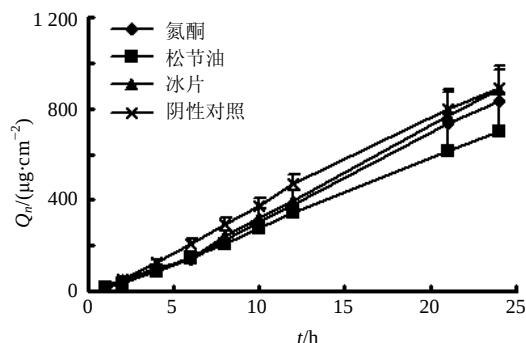
2.3.2 溶剂对天麻苷元透皮性的影响 分别用水, 10%、20%、30%乙醇, 30%丙二醇配制含天麻苷元 4 mg/mL 的供试品溶液, 采用上述透皮扩散试验法, 考察不同溶剂对天麻苷元透皮性能的影响, 结果见图 3 与表 2。乙醇与丙二醇对天麻苷元的透皮均有一定的促进作用, 渗透系数随体积分数的升高而增加。由于天麻苷元易溶于乙醇, 以 30%乙醇作为溶剂可兼具增溶和促透的效果。

图3 不同溶剂中天麻苷元的累积渗透曲线 ($n=5$)Fig. 3 Cumulative penetration curves of gastrodigenin in various solvents ($n=5$)

2.3.3 促透剂对天麻苷元透皮性的影响 以 30%乙醇为溶剂, 分别配制含 1%氮酮、1%松节油、1%冰片的 4 mg/mL 天麻苷元供试品溶液, 采用上述透皮扩散试验法, 考察常用促透剂对天麻苷元透皮性能的影响, 结果见图 4 与表 3。这几种促透剂都没有明显增强天麻苷元的透皮能力。

表2 不同溶剂中天麻苷元的渗透参数 ($n=5$)Table 2 Permeation parameters of gastrodigenin in various solvents ($n=5$)

溶剂	$J_s/(\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1})$	$P\times 10^3/(\text{cm}\cdot\text{h}^{-1})$	t_{lag}/h
水	23.5 ± 2.7	5.87 ± 0.67	1.06 ± 0.85
10%乙醇	26.7 ± 3.7	6.68 ± 0.93	0.52 ± 0.40
20%乙醇	33.1 ± 5.5	8.28 ± 1.37	1.21 ± 0.35
30%乙醇	38.4 ± 4.2	9.59 ± 1.06	0.49 ± 0.27
30%丙二醇	31.4 ± 3.1	7.84 ± 0.78	1.06 ± 0.24

图4 不同促透剂对天麻苷元的累积渗透曲线 ($n=5$)Fig. 4 Cumulative penetration curves of gastrodigenin using various penetration enhancers ($n=5$)表3 使用不同促透剂天麻苷元的渗透参数 ($n=5$)Table 3 Permeation parameters of gastrodigenin using various penetration enhancers ($n=5$)

透皮促进剂	$J_s/(\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1})$	$P\times 10^3/(\text{cm}\cdot\text{h}^{-1})$	t_{lag}/h
阴性对照	38.4 ± 4.2	9.59 ± 1.06	0.49 ± 0.27
氮酮	36.3 ± 2.0	9.07 ± 0.50	1.31 ± 0.23
松节油	30.1 ± 5.2	7.54 ± 1.31	0.98 ± 0.49
冰片	38.6 ± 4.4	9.66 ± 1.11	1.52 ± 0.34

2.3.4 透皮微粒载体对天麻苷元透皮性的影响^[10] 取天麻苷元适量, 溶于聚氧乙烯蓖麻油-大豆卵磷脂-乙醇-肉豆蔻酸异丙酯-水 (3:1:2:1:10) 空白微乳中, 得天麻苷元微乳。

取天麻苷元 40 mg, 大豆卵磷脂 300 mg 溶于 3 mL 乙醇中, 在搅拌下缓慢滴水至 10 mL, 滴完后继续搅拌 10 min, 再在冰水浴条件下探头超声 60 s, 得天麻苷元醇质体。

将天麻苷元微乳与天麻苷元醇质体 (含天麻苷元 4 mg/mL) 采用上述透皮扩散试验法, 考察两种常用透皮微粒载体对天麻苷元透皮能力的影响, 结果见图 5 与表 4。与阴性对照 (4 mg/mL 天麻苷元水溶液) 相比, 两种载体均没有表现出显著的促透作用。

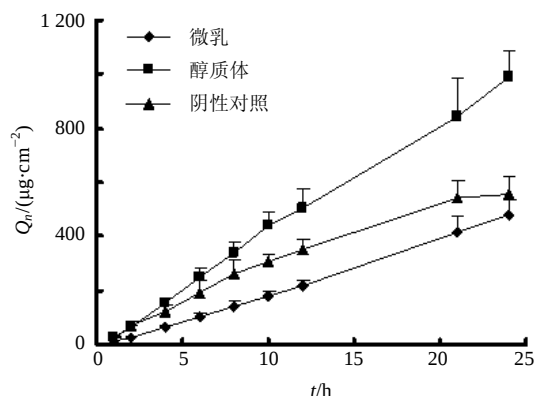


图 5 不同微粒载体中天麻苷元的累积渗透曲线 ($n=5$)

Fig. 5 Cumulative penetration curves of gastrodigenin loaded in various particle carriers ($n=5$)

表 4 不同微粒载体中天麻苷元的渗透参数 ($n=5$)

Table 4 Permeation parameters of gastrodigenin loaded in various particle carriers ($n=5$)

载体	$J_s/(\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1})$	$P\times 10^3/(\text{cm}\cdot\text{h}^{-1})$	t_{lag}/h
阴性对照	23.5 ± 2.7	5.87 ± 0.67	1.06 ± 0.85
微乳	20.5 ± 2.6	5.13 ± 0.65	0.93 ± 0.17
醇质体	41.4 ± 5.1	10.34 ± 1.29	0.57 ± 0.29

2.4 皮肤刺激性试验

选取健康家兔,采用同体左右侧自身对比法进行皮肤刺激性试验^[11]。设置两个试验组:天麻苷元饱和水溶液(生理盐水配制)组与天麻苷元凝胶剂

(含 5%天麻苷元、1%卡波姆、30%乙醇、5%丙二醇、1.5%三乙醇胺及 0.03%的尼泊金乙酯)组,每组 3 只动物,单笼饲养。试验前 24 h 将家兔背部两侧毛剔除,去毛面积左、右各 $3\text{ cm}\times 3\text{ cm}$,不得损伤皮肤。每天两组动物右侧去毛皮肤分别涂抹 0.5 mL 天麻苷元饱和溶液或 0.5 g 天麻苷元凝胶剂,左侧皮肤则涂抹相应的空白基质作对照,然后用两层纱布覆盖,并用胶布加以固定。给药 6 h 后去除遮盖物,并用温水清洁给药部位,连续 7 d。在每次去除药物后 1 h,再次贴敷前,以及末次给药后 1、24、48、72 h 肉眼观察,记录红斑及水肿、涂敷部位是否有色素沉着、出血点、皮肤粗糙或皮肤菲薄情况及其发生与消退时间。

皮肤刺激反应评分标准:红斑勉强可见为 1 分,中度红斑为 2 分,严重红斑为 3 分,紫色红斑并有焦痂形成为 4 分;水肿勉强可见为 1 分,皮肤隆起轮廓清楚为 2 分,隆起 1 mm 为 3 分,隆起 1 mm 以上并有扩大为 4 分。皮肤刺激强度评价标准:分值 <0.50 分为无刺激性,分值 $0.50\leq$ 分值 <3.00 分为轻度刺激性, $3.00\leq$ 分值 <6.00 为中度刺激性,分值 ≥ 6.00 为强刺激性^[10]。结果见表 5。实验中两组各有一只家兔出现了轻度红斑,停药后反应消失,平均反应分值低于 0.5。依照上述标准判定天麻苷元溶液剂及其凝胶剂均无皮肤刺激性。

表 5 家兔皮肤刺激试验结果 ($n=3$)

Table 5 Results of rabbit skin irritation test ($n=3$)

组别	不同给药时间皮肤刺激分值										刺激强度
	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d	8 d	9 d	10 d	
溶液剂	0	0	0	0.33	0.33	0.33	0.33	0.33	0	0	无刺激性
凝胶剂	0	0	0.33	0.33	0.33	0.33	0.33	0.33	0	0	无刺激性

3 讨论

天麻素与天麻苷元均为典型的小分子化合物,二者在化学结构上仅相差一分子葡萄糖,但天麻苷元的脂溶性明显较强,其油水分配系数高出天麻素近 200 倍,导致二者透皮性能存在较大差异:同样是以大鼠背部皮肤为屏障,天麻苷元的渗透系数值为 7.74 cm/h ,而据文献报道^[12],天麻素的渗透系数值仅为 0.421 cm/h 。

尽管不同质量浓度(饱和液与 4 mg/mL)天麻苷元水溶液的渗透速率常数相差很大,但二者渗透系数值却很接近,说明天麻苷元的透皮过程符合 Fick 扩散定律,即透皮速度与药物质量浓度成正相

关,天麻苷元主要是借助浓度差以被动扩散的方式经皮转运。

在药剂学上,经皮给药常用的促透策略有两种:其一,加入透皮吸收促进剂,可逆地改变角质层的扩散阻力,促进药物进入或透过皮肤;其二,对药物分子进行包载,从而改变其表面理化特性以提高透皮性能^[13]。但本研究结果表明,所考察的常用促透剂、微粒载体对天麻苷元的透皮性均无显著改善作用。究其原因,可能由于天麻苷元本身较易透皮,使得这些药剂学手段的效果不明显。天麻苷元的渗透速率主要与其质量浓度相关,故可通过选择良溶剂,增加药物质量浓度以提高透皮速率。

由于天麻苷元经皮给药制剂在眩晕、神经衰弱等疾病中的应用一般为多次给药,也可避免受损皮肤给药的情况。因此,在家兔皮肤刺激性试验中,未进行单次给药以及受损皮肤试验。该动物模型比人皮肤刺激反应更为敏感,评价结果可靠。

同为天麻的主要活性成分,天麻苷元与天麻素的药理作用相近,且化学结构更简单,易于合成制备。但到目前为止,尚未有任何一种天麻苷元的制剂应用于临床。本研究结果表明,天麻苷元透皮性能良好,且无皮肤刺激性,适于制备经皮给药制剂,具有很好的开发前景。

参考文献

- [1] Ojemann L M, Nelson W L, Shin D S, *et al.* Tianma, an ancient Chinese herb, offers new options for the treatment of epilepsy and other conditions [J]. *Epilepsy Behav*, 2006, 8(2): 376-383.
- [2] 陈颖, 常琪, 刘新民. 天麻对中枢神经系统作用的研究进展 [J]. *中草药*, 2007, 38(6): 4-6.
- [3] 蒲香兰, 李松, 李鹏. 舒天宁颗粒质量标准研究 [J]. *现代药物与临床*, 2009, 24(2): 105-108.
- [4] 郭正平, 谭天秩, 钟裕国, 等. 天麻素及天麻甙元作用机理的研究 [J]. *华西医科大学学报*, 1991, 22(1): 79-82.
- [5] 蔡铮, 侯世祥, 刘中秋, 等. 灌胃天麻素小鼠脑组织中天麻苷元的药动学研究 [J]. *中草药*, 2009, 40(3): 389-391.
- [6] 邓士贤, 莫云强. 天麻的药理研究(一)天麻素及天麻甙元的镇静及抗惊厥作用 [J]. *云南植物研究*, 1979, 1(2): 66-73.
- [7] 莫云强, 邓士贤. 天麻的药理研究(二)天麻素及天麻甙元对心脏及小肠的作用 [J]. *云南植物研究*, 1980, 2(2): 230-234.
- [8] 莫云强, 张连英, 熊建明, 等. 天麻的药理研究(三)天麻素及天麻甙元的抗惊厥、抗癫痫及对血压的作用 [J]. *云南医药*, 1983, 4(6): 388-390.
- [9] 赵辉. 天麻素的临床应用进展 [J]. *海峡药学*, 2009, 12(6): 29-31.
- [10] Santos P, Watkinson A C, Hadgraft J, *et al.* Application of microemulsions in dermal and transdermal drug delivery [J]. *Skin Pharmacol Physiol*, 2008, 21(5): 246-259.
- [11] 化学药物刺激性、过敏性和溶血性研究技术指导原则 [S]. 2005.
- [12] 王晓颖, 陈丹, 李孝栋, 等. 不同浓度氮酮对天麻体外透皮吸收的影响 [J]. *福建中医学院学报*, 2010, 20(3): 39-41.
- [13] Subedi R K, Oh S Y, Chun M K, *et al.* Recent advances in transdermal drug delivery [J]. *Arch Pharm Res*, 2010, 33(3): 339-351.