

## 基于主成分分析的金黄凝胶体外透皮吸收研究

陆兆光<sup>1,2,3</sup>, 闫明<sup>1,2,3</sup>, 杨晶<sup>1,2,3</sup>, 张红<sup>1,2,3</sup>, 吴云<sup>1,2,3</sup>, 丁岗<sup>1,2,3</sup>, 王振中<sup>1,2,3</sup>, 萧伟<sup>1,2,3\*</sup>

1. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏 连云港 222001
2. 中药制药过程新技术国家重点实验室, 江苏 连云港 222001
3. 中药提取精制新技术重点研究室, 江苏 连云港 222001

**摘要:** 目的 综合评价剂型改进后的金黄凝胶的体外透皮吸收效果, 为金黄凝胶新药开发提供体外渗透动力学方面的实验依据。方法 以离体大鼠背部皮肤为体外模型, 采用改良的 Franz 扩散池进行透皮吸收试验, 首先建立金黄凝胶和金黄油膏接收液及皮肤滞留样品的 HPLC 指纹图谱, 并对指纹图谱原始数据进行主成分分析 (PCA); 其次确定金黄凝胶与金黄油膏共有的药物组分峰, 求出各共有峰的面积, 应用 PCA 法求得 PCA 载荷图; 最后以复方中透皮吸收效果较好的芍药苷为代表, 对体外渗透动力学进行考察。结果 金黄凝胶药物组分的整体体外透皮吸收效果优于金黄油膏, 芍药苷的体外透皮吸收符合零级动力学过程, 且金黄凝胶中芍药苷的累积透过量、透皮速率及皮肤滞留量均高于金黄油膏。结论 改进剂型后的金黄凝胶整体体外透皮吸收效果更好。PCA 法是研究中药经皮给药制剂体外透皮吸收实验的有效手段。

**关键词:** 金黄凝胶; 金黄油膏; 主成分分析; 体外透皮吸收; HPLC; 指纹图谱; 渗透动力学; 芍药苷

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)15-2635-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.15.009

## *In vitro* percutaneous penetration studies of Jinhuang Gel based on principal component analysis

LU Zhao-guang<sup>1,2,3</sup>, YAN Ming<sup>1,2,3</sup>, YANG Jing<sup>1,2,3</sup>, ZHANG Hong<sup>1,2,3</sup>, WU Yun<sup>1,2,3</sup>, DING Gang<sup>1,2,3</sup>, WANG Zhen-zhong<sup>1,2,3</sup>, XIAO Wei<sup>1,2,3</sup>

1. Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co., Ltd., Lianyungang 222001, China
2. State Key Laboratory of Pharmaceutical Process New-teach for Chinese Medicine, Lianyungang 222001, China
3. The Key Laboratory for the New Technique Research of TCM Extraction and Purification, Lianyungang 222001, China

**Abstract: Objective** To comprehensively evaluate the *in vitro* percutaneous penetration and provide the experimental basis of *in vitro* kinetics for new drug development of Jinhuang Gel. **Methods** The skin penetration of Jinhuang Gel was investigated through *in vitro* excised rat skin using the improved Franz diffusion cell. HPLC fingerprint of receptive solution and skin retention was established and analyzed using principal component analysis (PCA). The common peaks of HPLC fingerprint between Jinhuang Gel and Jinhuang Ointment were selected and each area was calculated to obtain the PCA biplot. Paeoniflorin as a representative of common peaks was used to investigate the *in vitro* permeation kinetics. **Results** The results showed that the PCA biplot based on common peaks areas displayed that the global *in vitro* transdermal absorption effects of Jinhuang Gel were significantly better than those of Jinhuang Ointment. The *in vitro* transdermal absorption of paeoniflorin followed zero kinetics, and the cumulative permeation amount, permeation rate, and skin retention of paeoniflorin from Jinhuang Gel were superior to those from Jinhuang Ointment. **Conclusion** Jinhuang Gel could improve the overall effects of *in vitro* percutaneous absorption. PCA is an effective means for investigating *in vitro* percutaneous absorption experiments of Chinese materia medica for transdermal administration.

**Key words:** Jinhuang Gel; Jinhuang Ointment; principal component analysis; *in vitro* percutaneous penetration; HPLC; fingerprint; penetration kinetics; paeoniflorin

收稿日期: 2016-01-26

基金项目: 科学技术项目国家重大新药创制项目 (2013ZX09402203)

作者简介: 陆兆光, 男, 硕士, 助理研究员, 研究方向为中药新药研发。E-mail: luzg83@126.com

\*通信作者 萧伟, 男, 研究员级高级工程师, 博士, 研究方向为中药新药的研究与开发。

Tel: (0518)81152337/13905136437 E-mail: kanionlunwen@163.com

金黄油膏 (Jinhuang Ointment) 是苏州市中医院骨伤科的协定处方, 由赤芍、天花粉等 5 味中药组成, 临床用于软组织损伤、骨折早期及骨性关节炎等病症, 尤其对热性肿痛效果良好<sup>[1]</sup>。但原制剂为油膏, 处方药味均以细粉入药, 存在药物释放不完全、质量可控性差、使用不便等缺点。与之相比, 凝胶剂作为一种新型的外用制剂, 具有载药量大、生物相容性好、使用方便、舒适等多种优点。因此, 为了有效解决金黄油膏临床应用的顺应性, 克服其剂型上的不足, 拟将其开发为金黄凝胶 (Jinhuang Gel) 6 类新药<sup>[1-2]</sup>。

但剂型改变后的金黄凝胶能否增加药物成分的透皮吸收效果尚不清楚, 而常用的中药经皮给药制剂体外透皮吸收研究方法, 常常只能选择单个或几个药物成分作为指标, 并不能代表中药经皮给药制剂整体药物成分的透皮规律<sup>[3-6]</sup>。本研究采用主成分分析 (PCA) 法对金黄凝胶经皮给药的整体药物组分的 HPLC 指纹图谱进行综合评价, 克服了由单个或几个药物成分作为评价指标研究透皮规律的缺陷, 并在 PCA 揭示出各共有药物组分峰面积表现出相似的体外透皮吸收规律的基础上, 以金黄凝胶中透皮吸收效果较好的芍药苷色谱峰为代表, 对累积透过量、透皮速率及皮肤滞留量等指标进行考察。

## 1 仪器与材料

Agilent 1200 高效液相色谱仪, 美国安捷伦科技有限公司; TPY-2 智能透皮扩散试验仪, 上海黄海药检仪器有限公司; BS124S Sartorius 电子天平, 北京赛多利斯科学仪器有限公司; GL-16 型离心机, 上海安亭科学仪器厂。金黄凝胶, 批号 20150101, 每克金黄凝胶含芍药苷 0.89 mg, 相当于生药 0.23 g, 江苏康缘药业股份有限公司研制; 金黄油膏 (对照药物), 批号 20130510, 相当于生药 0.23 g, 苏州市中医院院内制剂; 空白凝胶 (空白组), 批号 20150101, 江苏康缘药业股份有限公司; 芍药苷对照品, 质量分数 94.9%, 批号 110736-201337, 中国食品药品检定研究院; 实验所用试剂甲醇与乙腈为色谱纯, 磷酸为分析纯, 纯化水 (自制)。

SD 大鼠 10 只, 购于浙江省实验动物中心, 雄性, 体质量 150~200 g, 生产许可证号 SCXK (浙) 2014-0001, 质量合格证号 0016661。

## 2 方法与结果

### 2.1 大鼠离体皮肤制备

健康大鼠 10 只, 雄性, 体质量 150~200 g, 实

验室饲养 1 周以适应环境。实验前小心剪去背部体毛 (注意不要损伤皮肤), 然后将大鼠脱颈处死, 剥离背部皮肤, 将取下的皮肤平铺于玻璃片上, 角质层朝下, 仔细去除其皮下脂肪及黏连组织, 再用生理盐水反复冲洗干净, 滤纸吸干表面水分, 用锡箔纸包裹后放入冰箱 (-20 °C) 冷冻保存, 1 周内用完。每次实验前仔细检查鼠皮的完整性, 有任何破损的皮肤不能用于实验。

### 2.2 体外透皮吸收实验

实验分为实验组 (金黄凝胶,  $n=9$ )、对照组 (金黄油膏,  $n=9$ ) 和空白组 (空白凝胶,  $n=3$ )。实验前从冰箱中取出备用皮肤, 室温下自然解冻, 并用无菌生理盐水漂洗至无浑浊, 滤纸吸干表面水分备用。取约 50 mg 金黄凝胶 (与金黄油膏生药材用量一致), 均匀涂于皮肤表面, 将大鼠皮肤固定在竖式 Franz 扩散池 (扩散池面积为 1.67 cm<sup>2</sup>, 体积为 6.5 mL) 的上下两室之间, 使角质层面向上, 用弹簧夹固定, 接收池中加入满生理盐水作为接收液, 恒温 (37.0±0.2) °C, 磁力搅拌子转速 300 r/min。分别于 2、4、6、8、10、12、24 h 从接收池中取出 0.5 mL 接收液, 并立即补加等量的恒温 (37.0±0.2) °C 新鲜生理盐水。按上述方法完成对照组与空白组的体外透皮吸收实验。

### 2.3 接收液与皮肤样品的制备

将各时间点吸取的 0.5 mL 接收液分别置于 1.5 mL 的离心管中, 转速 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液至高效液相样品瓶中; 将实验结束后的有效扩散面积大鼠皮肤剪切下来, 并剪碎置于玻璃匀浆器中, 加入 0.5 mL 甲醇充分匀浆, 匀浆液离心后, 取上清液 0.2 mL 加入装有内插管的高效液相样品瓶中, 待测。

### 2.4 供试品溶液制备

称取金黄凝胶 4 g 置于 20 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 超声处理 10 min, 转速 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液作为供试品溶液。

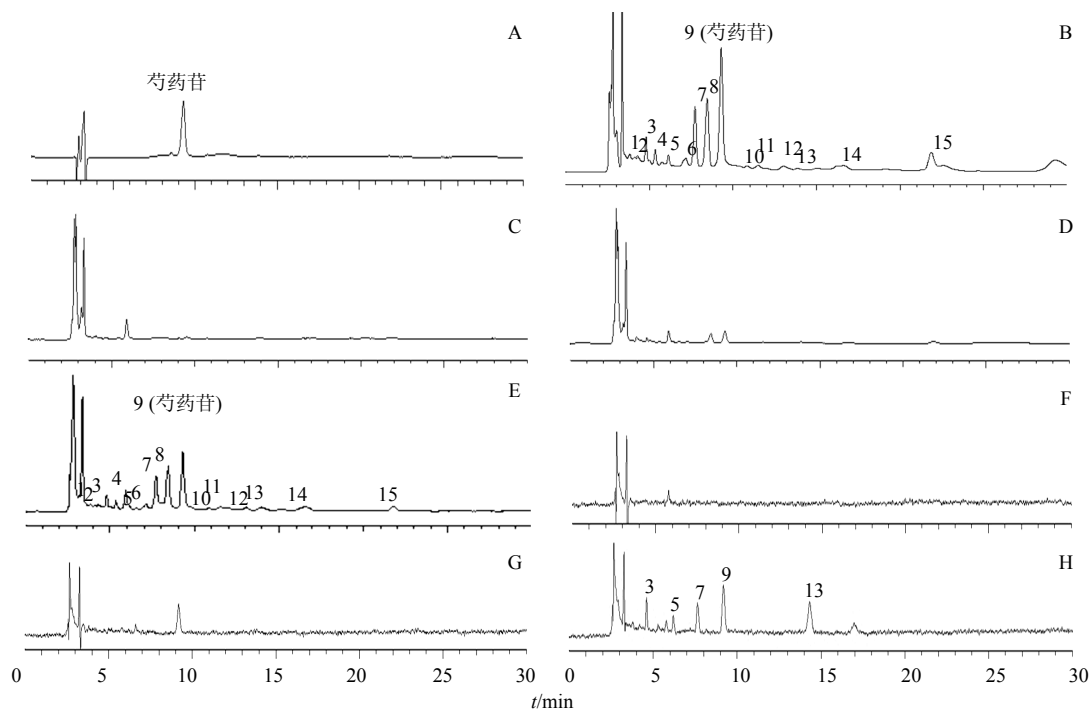
### 2.5 HPLC 分析方法的建立<sup>[7-8]</sup>

**2.5.1 HPLC 条件** 色谱柱为 Agilent SB-C<sub>18</sub> 柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液 (14:86), 检测波长 230 nm, 体积流量 1.0 mL/min, 柱温 30 °C, 进样量 10 μL。

**2.5.2 专属性考察** 空白组与实验组 24 h 时间点的接收液及实验结束后的皮肤经处理后进样分析, 结果表明空白组接收液与空白组皮肤样品的色谱峰均

不干扰金黄凝胶有效成分芍药苷的 HPLC 测定, 且能够与金黄凝胶其他药物组分的色谱峰很好地分离, 见图 1。

**2.5.3 对照品溶液的配制和标准曲线的建立** 精密称取芍药苷对照品 4.600 mg, 置 20 mL 量瓶中, 加适量甲醇溶解, 并稀释至刻度, 摇匀, 得对照品储



A-对照品 B-金黄凝胶供试品 C~E 分别为空白组、对照组、实验组皮肤滞留样品 F~H 分别为空白组、对照组、实验组接收液样品  
A-reference substance B-Jinhuang Gel sample C—E-skin retention samples in blank group, control group, and experimental group, respectively;  
F—H-solution in blank group, control group, and experimental group, respectively

图 1 24 h 时间点接收液与皮肤滞留样品的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC of receptive solution and skin retention at 24 h time point

备液。精密量取对照品储备液 1.00 mL, 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 得芍药苷质量浓度为 9.2  $\mu\text{g/mL}$  的对照品溶液。精密量取 9.2  $\mu\text{g/mL}$  对照品溶液 0.25、0.50、1.00、2.00、3.00、4.00 mL, 置 5 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 得芍药苷质量浓度分别为 0.46、0.92、1.84、3.68、5.52、7.36  $\mu\text{g/mL}$  的系列对照品溶液。以芍药苷质量浓度为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y) 进行线性回归, 得回归方程  $Y=13.932 X+0.563 6$ ,  $r=0.998 8$ , 结果表明芍药苷在 0.46~7.36  $\mu\text{g/mL}$  线性关系良好。

**2.5.4 精密度试验** 取 9.2  $\mu\text{g/mL}$  的芍药苷对照品溶液进样 10  $\mu\text{L}$ , 重复进样 6 次, 芍药苷峰面积 RSD 值为 1.27%。

**2.5.5 稳定性试验** 取金黄凝胶皮肤滞留样品与 24 h 接收液样品分别进样, 每次进样 10  $\mu\text{L}$ , 每隔 12 h 进样 1 次, 3 d 内测定 6 次, 结果显示芍药苷及其他主要色谱峰面积基本保持不变, 金黄凝胶皮肤滞留样品与 24 h 接收液样品中芍药苷峰面积 RSD

值分别为 2.13% 和 2.26%。

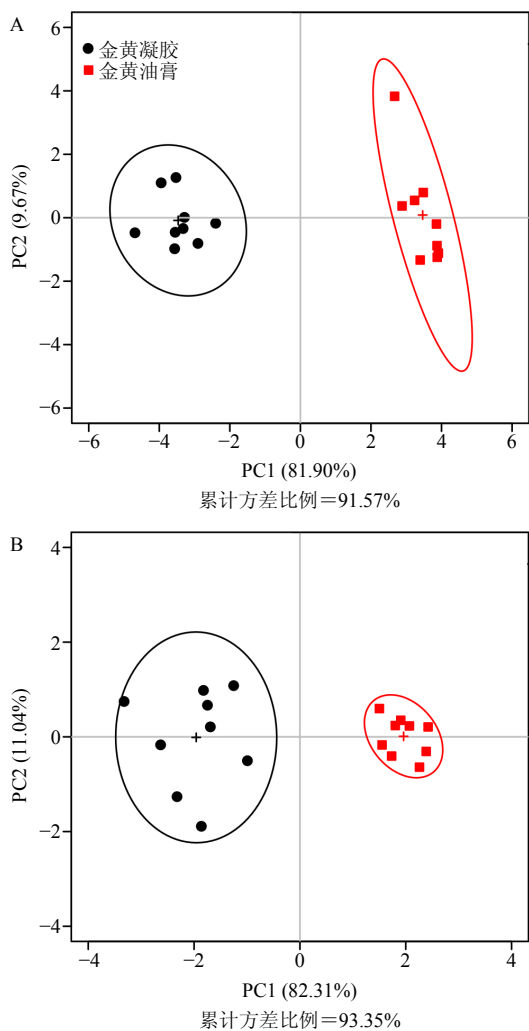
**2.5.6 重复性试验** 按“2.4”项下方法制备金黄凝胶供试品溶液, 平行 6 份, 分别进样 10  $\mu\text{L}$ , 结果表明图 1-B 中 15 个药物组分散谱峰面积的 RSD 均小于 3.00%, 其中芍药苷峰面积 RSD 为 1.77%。

**2.5.7 加样回收率试验** 将各组 24 h 空白组接收液混合, 作为空白接收液备用。取芍药苷对照品溶液适量加入空白接收液中, 配制成含芍药苷 0.46、0.92、1.84  $\mu\text{g/mL}$  的低、中、高 3 个质量浓度的对照品溶液各 3 份, 进样 10  $\mu\text{L}$  测定, 计算回收率分别为 105.7%、103.2%、99.7%, RSD 分别为 2.17%、1.78%、1.43%。

## 2.6 数据处理

**2.6.1 PCA** 在完成体外透皮实验样品的 HPLC 测定后, 对接收液及皮肤滞留样品进行 PCA。首先导出金黄凝胶和金黄膏 24 h 时间点 HPLC 色谱图的 CSV 格式原始数据, 然后将 CSV 数据通过 R 软件 (<https://www.r-project.org/>) 做 PCA 运算, 得到 PCA

得分图。PCA 得分图直观形象地显示金黄凝胶组和金黄油膏组的接收液及皮肤滞留样品均能够完全分开(图 2), 表明金黄凝胶和金黄油膏组无论在接收液还是在皮肤滞留样品中, 其 HPLC 指纹图谱均整体表现出显著性差异。



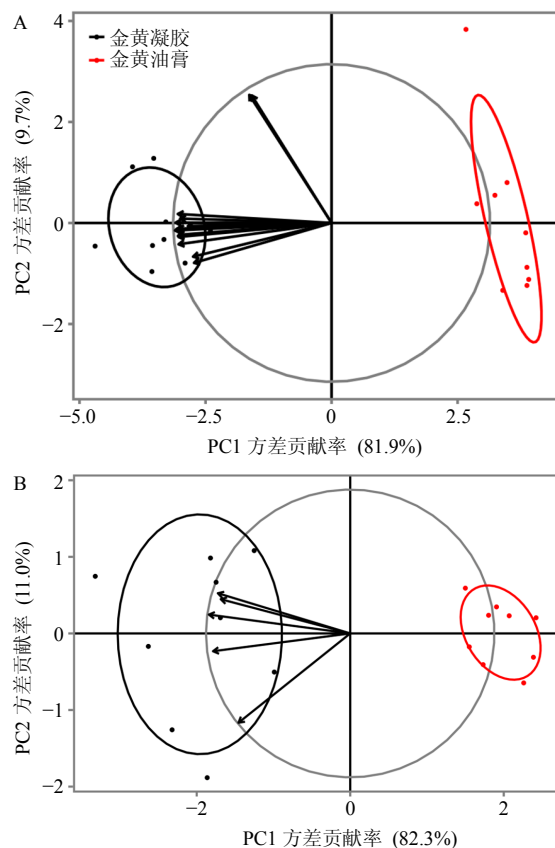
图中的每 1 个点代表 1 个样本, 下同  
Each point in the plot represents one sample, same as below

图 2 皮肤滞留样品 (A) 与接收液样品 (B) HPLC 指纹图谱数据的 PCA

Fig. 2 PCA score plot of HPLC fingerprint data from skin retention (A) and receptive solution (B)

基于 HPLC 的特征谱图和色谱峰保留时间是鉴定化合物的基础, 而色谱响应强度(如峰高、峰面积)是定量不同样品或组别之间差异的基础<sup>[9]</sup>。本实验从金黄凝胶与金黄油膏 24 h 时间点的接收液和皮肤滞留样品的指纹图谱中共找出了 15 个共有药物组分峰(图 1-B), 该 15 个共有药物组分峰是通过对比给药组样品、金黄凝胶供试品与空白组样品

的色谱峰保留时间, 排除空白样品色谱峰干扰后的共有峰。首先对这 15 个共有药物组分峰的峰面积数据进行标准化处理[标准化数据=(峰面积-该列平均峰面积)/该列的标准差], 然后经标准化处理的数据作为输入变量进行 PCA, 求出金黄凝胶和金黄油膏在接收液与皮肤滞留样品中的 PCA 载荷图(图 3)。PCA 载荷图直观形象地展示出各共有药物组分峰的峰面积变量与金黄凝胶组变量在空间上相聚较近, 表明各药物组分峰的峰面积与金黄凝胶组正相关程度高, 即金黄凝胶组药物组分的整体透皮效果优于金黄油膏组; 另外, 各峰面积变量距离原点较远且远近相似, 说明各峰面积变量均可以被这 2 个主成分充分解释, 且各峰面积变量表现出相似的体外透皮吸收特征。



空间上相聚越近的变量, 正相关程度越高; 距离原点越远说明该变量被这 2 个主成分解释得越充分

The variables on the space are closer together with each and the degree of positive correlation is higher between two variables. The distance from the origin is farther and the variables are more fully explained by the two principal components

图 3 皮肤滞留样品 (A) 与接收液样品 (B) 共有药物组分峰的主成分分析载荷图

Fig. 3 PCA biplot of common peak areas from skin retention (A) and receptive solution (B)

2.6.2 累积透过量 ( $Q$ ) 与皮肤滞留量 ( $Q_s$ ) 计算方法<sup>[4]</sup> 通过上述 PCA 得知各共有药物组分峰的体外透皮吸收特征相似, 为了能够揭示金黄凝胶体外渗透动力学特征, 选择了复方中透皮吸收效果较好的有效成分芍药苷为代表, 对  $Q$ 、透皮速率及  $Q_s$  等指标进行考察。芍药苷  $Q$  按照下列公式计算。

$$Q_n = (VC_n + \sum_{i=1}^{n-1} C_i V_i) / A$$

其中  $Q_n$  为第  $n$  个时间点 (金黄凝胶与金黄油膏中芍药苷均从 6 h 检测到) 的  $Q$  ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ),  $C_n$  为第  $n$  个时间点测得的芍药苷质量浓度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ),  $C_i$  为第  $i$  个时间点测得的芍药苷质量浓度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ),  $V_i$  为每次取样的体积 (mL), 实验中扩散池容积 ( $V$ ) 为 6.5 mL, 有效扩散面积 ( $A$ ) 为  $1.67 \text{ cm}^2$

以  $Q$  对渗透时间  $t$  进行线性回归 (图 4), 所得方程即为渗透动力学方程, 所得斜率即为透皮速率常数 [ $J_s, \mu\text{g}/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})$ ]。芍药苷体外渗透动力学参数及  $Q_s$  见表 1。综上所述芍药苷在 2 种剂型中的体外透皮行为满足零级动力学过程, 且金黄凝胶组中芍

药苷的  $Q_{24}$ 、 $J_s$  及  $Q_s$  均显著高于金黄油膏组。由于 PCA 显示各共有药物组分峰的体外透皮吸收特征相似, 因此其他药物组分在金黄凝胶中的体外透皮行为也应满足零级动力学过程。

### 3 讨论

中药经皮给药制剂是一种高度复杂的混合体系, 临床上常以多物质多靶点的方式协调发挥疗效,

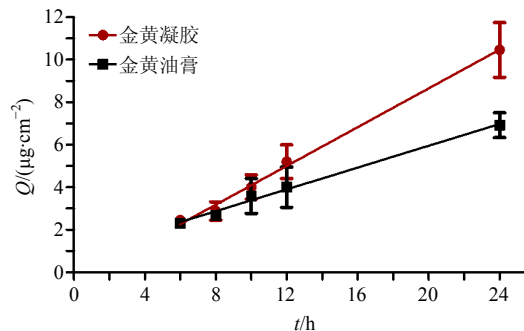


图 4 金黄凝胶与金黄油膏中芍药苷的透皮吸收曲线  
Fig. 4  $Q-t$  curves of paeoniflorin from Jinhuang Gel and Jinhuang Ointment

表 1 芍药苷体外渗透动力学参数及皮肤滞留量

Table 1 *In vitro* permeation kinetics parameters and skin retention amount of paeoniflorin

药物	$Q_{24}/(\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2})$	渗透动力学方程	$r$	$J_s/(\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1})$	$Q_s/(\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2})$
金黄凝胶	$10.461 \pm 0.892$	$Q = 0.456 2 t - 0.469 6$	0.998 0	0.456	$10.891 \pm 0.785$
金黄油膏	$6.921 \pm 0.589$	$Q = 0.256 5 t + 0.824 7$	0.996 2	0.257	$1.821 \pm 0.259$

因此全面综合地评价中药经皮给药制剂的透皮规律, 能够为其药效的发挥提供重要的物质基础。目前在研究中药经皮给药制剂体外透皮吸收过程中, 由于中药经皮给药制剂复杂的物质基础, 通常只能选择单个或几个药物成分作为评价指标, 很难代表其整体药物成分的透皮规律。因此, 寻找一种更加全面综合的评价透皮规律方法, 是中药经皮给药制剂现代化研究的一个重要方面<sup>[10]</sup>。

PCA 是一种基于投影技术的多元统计分析方法, 它可以利用投影的方法将原始数据产生的数学模型进行降维处理以化繁为简, 在不损失或尽量少损失原有信息的情况下把多个变量转化成较少几个重要变量且包含原有大部分信息的多元统计方法, 该方法排除了原始数据中相互重叠的信息, 避免了评价中主观加权的弊端, 从而直观地发现样品或组别之间的差异<sup>[9-12]</sup>。

本研究对金黄凝胶经皮给药的整体药物组分的指纹图谱原始数据及 15 个共有药物组分峰面积分别进行 PCA, 克服了由单个或几个药物成分作为评

价指标研究透皮规律的缺陷。PCA 的结果表明金黄凝胶组药物组分的整体体外透皮吸收效果优于金黄油膏组。实验中选择透皮吸收效果较好的芍药苷色谱峰为代表, 对  $Q$ 、 $J_s$  及  $Q_s$  等指标进行考察, 结果表明芍药苷在 2 种剂型中的体外透皮行为符合零级动力学过程, 且金黄凝胶组中芍药苷的  $Q$ 、 $J_s$  及  $Q_s$  均显著高于金黄油膏组。由于 PCA 显示各峰面积变量具有相似的体外透皮吸收特征, 因此可知金黄凝胶组中其他药物组分的  $Q_{24}$ 、 $J_s$  及  $Q_s$  也应显著高于金黄油膏组, 且金黄凝胶组中其他药物组分的体外透皮吸收行为应满足零级动力学过程。以上研究结果与前期研究发现金黄凝胶对大鼠急性软组织损伤的治疗作用明显优于金黄油膏<sup>[13]</sup>是相符的。

志谢: 南京理工大学环境与生物工程学院李明会博士帮助本实验结果进行 PCA 数据处理。

### 参考文献

[1] 唐建兰, 刘承伟, 王丹丹, 等. 金黄凝胶制剂成型工艺研究 [J]. 中草药, 2015, 46(2): 207-210.

- [2] 唐建兰, 张 珊, 刘承伟, 等. 金黄凝胶制备及质量控制研究 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2015, 17(5): 1085-1089.
- [3] 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): 24-26.
- [4] Vizserálek G, Berkó S, Tóth G *et al.* Permeability test for transdermal and local therapeutic patches using skin PAMPA method [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2015, 76(8): 165-172.
- [5] 王 森, 欧水平, 管咏梅, 等. 良肤乳膏小鼠皮肤药物动力学的研究 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35(17): 2254-2257.
- [6] 王 平, 刘善新. 颈痛舒贴片中芍药苷的体外透皮吸收研究 [J]. 中国现代应用药学, 2014, 31(1): 66-69.
- [7] 蔡 郁, 刘新颜, 梁文革. 以经皮微渗析技术研究芍药苷大鼠经皮吸收 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(10): 116-118.
- [8] 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.
- [9] 阿基业. 代谢组学数据处理方法——主成分分析 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2010, 15(5): 481-489.
- [10] Trygg J, Holmes E, Lundstedt T. Chemometrics in metabonomics [J]. *J Proteome Res*, 2007, 6(2): 469-479.
- [11] 张耀奇, 潘 扬. 术类中药及其相关成药质量的主成分分析 [J]. 南京中医药大学学报, 1997, 13(3): 149-150.
- [12] 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.
- [13] 程 玥, 唐朝辉, 曹 亮, 等. 金黄凝胶对大鼠急性软组织损伤的治疗作用研究 [J]. 现代药物与临床, 2015, 30(7): 768-773.