

战骨提取物中柚皮素透皮吸收促进剂的筛选

黄秋洁¹, 叶 勇^{2*}, 魏涌标^{2*}, 刘华钢², 韦冬迷², 阮 慧²

1. 广西中医药大学, 广西 南宁 530001

2. 广西医科大学, 广西 南宁 530021

摘要: 目的 筛选战骨提取物中柚皮素的最佳透皮促渗剂及其用量。方法 以大鼠腹部皮肤为实验屏障, 用改良 Franz 扩散池法建立离体经皮吸收实验方法, 收集战骨提取物中柚皮素的透皮接收液, 用高效液相色谱法测定其透皮速率。结果 以冰片、薄荷脑、氮酮作为促渗剂对柚皮素的透皮吸收有不同程度的促进作用, 其促渗作用强度冰片>薄荷脑>氮酮, 当冰片用量为 5%时, 柚皮素的透皮速率可达 0.136 8 mg/(cm²·h)。结论 以 5%冰片作为促渗剂时可以较好地促进战骨提取物中柚皮素的经皮吸收。

关键词: 战骨提取物; 柚皮素; 冰片; 薄荷脑; 氮酮; 促渗剂; 透皮吸收

中图分类号: R283 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)16-3366-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.16.018

Screening of transdermal enhancer of naringenin in *Premna fulva* extract

HUANG Qiu-jie¹, YE Yong², WEI Yong-biao², LIU Hua-gang², WEI Dong-mi², RUAN Hui²

1. Guangxi University of TCM, Nanning 530001, China

2. Guangxi Medical University, Nanning 530021, China

Abstract: Objective To screen the best transdermal enhancers of naringenin in *Premna fulva* extract. **Methods** Using abdominal skin of rats as experimental barrier, the *in vitro* percutaneous absorption experiment was established by modified Franz diffusion cell method. The cumulative infiltration and permeation rate of naringenin in three different penetration enhancers were determined by HPLC. **Results** The borneol, menthol, and azone could enhance transdermal absorption of naringenin in different degree. Several penetration enhancers were increased in the following order: borneol > menthol > azone. The average percutaneous rate of naringenin was 0.136 8 mg/(cm²·h), using 5% borneol as penetration enhancer. **Conclusion** The 5% borneol is an effective transdermal enhancer for naringenin in *P. fulva* extract.

Key words: *Premna fulva* extract; naringenin; borneol; menthol; azone; penetration enhancers; transdermal absorption

战骨为马鞭草科植物黄毛豆腐柴 *Premna fulva* Craib 的干燥茎, 收录于《广西壮族自治区壮药质量标准(第一卷)》。壮医认为其具有祛风毒、除湿毒、通龙路、散瘀止痛、强筋健骨的功效^[1-3], 广西壮族民间常用于治疗肥大性脊椎炎、风湿性关节痛等。研究发现, 战骨茎中主要含黄酮类、甾体类、三萜类及有机酸类成分, 课题组前期研究也表明柚皮素、芹菜素等黄酮类物质可能是战骨提取物中的主要活性成分。广西百会药业以战骨为原料, 采用稀醇浸

渍法代替水煮法, 提取其有效成分黄酮类化合物生产的独家品种健骨注射液^[4]具有抗炎消肿、镇痛的作用, 临床上治疗肥大性脊椎炎、风湿性及类风湿性关节炎、肩周炎等病症疗效显著, 健骨注射液质量标准中也将测定提取物和制剂中的柚皮素作为质控指标。虽然健骨注射液在临床上取得了一定的疗效, 但由于中药注射液制备技术等原因, 尚未能达到最理想的治疗效果。为了更有效合理地开发战骨药材, 本课题组拟将其开发成一种新型的经皮给药

收稿日期: 2017-07-12

基金项目: 广西自然科学基金(2013GXNSFBA019149); 广西医科大学大学生创新创业训练计划项目(2013cxcy118); 广西医科大学未来学术之星大学生课外科研课题(WLXSZX1403)

作者简介: 黄秋洁, 副教授。Tel: 13737172226 E-mail: hqj8@163.com

*通信作者 叶 勇, 副教授。E-mail: yong-ye@163.com

魏涌标, 副教授。E-mail: 605142113@qq.com

制剂,本研究考察不同促渗剂及其质量分数对战骨提取物中主要活性成分柚皮素体外经皮吸收的影响,以筛选最佳的促渗剂及其最佳质量分数,为开发以战骨为原料的透皮制剂奠定基础。

1 仪器与材料

RYJ-6B型药物透皮扩散试验仪,7.0 mL扩散池,扩散面积 2.27 cm^2 (上海黄海药检仪器有限公司);KQ-50DB型数控超声波清洗器(江苏省昆山市超声仪器有限公司);LC-20A型高效液相色谱仪(Shimadzu公司);XS205DU电子分析天平(梅特勒托利多有限公司);R-1001N型旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂)。

战骨采自广西宜州市怀远镇,经广西中医药大学傅鹏副教授鉴定为马鞭草科豆腐柴属植物黄毛豆腐柴 *Premna fulva* Craib 的干燥茎;柚皮素对照品(批号 Y-030-150714,质量分数 $>98\%$)购自中国食品药品检定研究院;甲醇(色谱纯);超纯水(实验室自制);氮酮(上海三浦化工有限公司,批号 Z21J7Y18210);其他试剂均为分析纯。

SD雄性大鼠(SPF级),体质量 $150\sim 180\text{ g}$,由广西医科大学实验动物中心提供,实验动物生产许可证号 SCXK(桂)2014-0002,质量合格证号 45000300000530。

2 方法与结果

2.1 柚皮素的体外分析方法建立

2.1.1 战骨提取物的制备 精密称取战骨药材细粉 250 g ,加入10倍量 80% 乙醇回流提取2次,每次1 h,提取液浓缩至膏状,经D101大孔树脂柱上样,先用蒸馏水洗脱至无色,再用3倍柱体积 40% 乙醇洗脱,合并乙醇洗脱液,用 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过,取续滤液,备用。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取柚皮素对照品 10.30 mg ,置于 10 mL 量瓶中,加入 40% 乙醇溶解并定容至刻度,摇匀,稀释10倍后得到质量浓度为 0.103 mg/mL 的柚皮素对照品储备溶液①,备用。

2.1.3 色谱条件 依利特 Hypersil ODS2 色谱柱($250\text{ mm}\times 4.6\text{ mm}$, $5\text{ }\mu\text{m}$);流动相为乙腈- 0.2% 磷酸水溶液(30:70);检测波长 288 nm ;体积流量 1.0 mL/min ;柱温 $35\text{ }^\circ\text{C}$;进样量为 $10\text{ }\mu\text{L}$ 。

2.1.4 标准曲线的制备 精密吸取“2.1.2”项下柚皮素储备液① 1 mL ,置于 25 mL 量瓶中,用 40% 乙醇定容至刻度,摇匀,得到质量浓度为 $4.12\text{ }\mu\text{g/mL}$ 的柚皮素储备液②,备用。再分别精密吸取柚皮素

储备液② $1\text{ }\mu\text{L}$,柚皮素储备液① 1 、 2 、 4 、 8 、 16 、 $20\text{ }\mu\text{L}$,按上述色谱条件进样,以峰面积积分对进样量进行线性回归,得柚皮素回归方程 $Y=230\ 077.5 X-9\ 255.7$, $r=0.999\ 9$ 。结果表明,柚皮素在 $0.004\ 12\sim 2.060\text{ }\mu\text{g}$ 与峰面积线性关系良好。

2.1.5 精密度的试验 取柚皮素储备液①,按“2.1.3”项下色谱条件1 d内重复进样6次,进样量为 $10\text{ }\mu\text{L}$,测定峰面积,结果其RSD为 0.29% ,表明仪器精密密度良好。

2.1.6 稳定性考察 取含药接收液滤过,分别于 0 、 2 、 4 、 6 、 8 、 12 、 24 h 吸取 $10\text{ }\mu\text{L}$ 供试液,注入高效液相色谱仪,测定峰面积,结果其RSD为 0.23% ,表明柚皮素在 24 h 内稳定。

2.1.7 重复性考察 取同一批战骨提取物,共6份,制备供试品溶液,分取上述溶液 $10\text{ }\mu\text{L}$ 注入高效液相色谱仪,测定峰面积,计算质量分数,结果RSD为 1.52% ,表明该方法的重复性良好。

2.1.8 回收率试验 取3份空白接收液,每份 5 mL ,分别精密加入一定量的柚皮素对照品储备液①,混匀得到低、中、高3个质量分数(20.6 、 41.2 、 $82.4\text{ }\mu\text{g/mL}$)的溶液,每个质量分数重复测定3次。结果平均回收率为 98.92% ,RSD为 1.77% 。

2.1.9 样品测定 取提取物约 0.1 g ,精密称定,置 25 mL 量瓶中,加入 40% 乙醇适量,超声处理 10 min ,放冷至室温,加 40% 乙醇至刻度,摇匀,滤过,进样 $10\text{ }\mu\text{L}$,测定并计算样品柚皮素的量为 158.6 mg/g 。

2.2 体外透皮吸收实验

2.2.1 离体大鼠皮肤的处理 用 0.8% Na_2S 溶液对大鼠进行脱毛处理,再用适量温水对脱毛区域进行清洁,正常饲养 24 h 后,将大鼠处死,取腹部皮肤,去掉皮下脂肪及黏液组织,用生理盐水洗净,浸泡在适量的生理盐水中,置冰箱中冷藏保存,实验前自然解冻^[5]。

2.2.2 体外透皮吸收实验方法 将离体大鼠皮肤固定于扩散池的供给池与接收池之间,角质层面面向供给池。供给池中加入 2 mL 含有相应促渗剂的战骨提取物浓缩溶液,接收池中加入 40% 乙醇生理盐水溶液,排出气泡,使液面恰与皮肤内层接触,调节扩散试验仪温度(37.0 ± 0.5) $^\circ\text{C}$,转速(120 ± 1) r/min ,分别于 1 、 2 、 4 、 6 、 8 、 10 、 12 h 抽取接收液 2.0 mL ,再补加等温同体积新鲜接收液。将各个时间点抽取的接收液挥干,用甲醇溶解定容至 1 mL , $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过,测定该供试品溶液中

柚皮素的量,并计算单位面积累积渗透量(Q)、稳态渗透速率(J_s)和增渗倍数(ER)^[6]。

$$Q = (C_n \times 7 + \sum_{i=1}^{n-1} C_i \times 2) / 2.27$$

$$J_s = dQ / dt$$

$$ER = J_s / J_0$$

Q 为 t 时间药物的单位面积累积透过量 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$), C_n 为第 n 个取样点测得的药物质量浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$), C_i 为第 i 个取样点测得的药物质量浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$), J_0 为未加促渗剂的渗透速率

2.2.3 不同促渗剂对战骨提取物中柚皮素经皮吸收的影响 在供给池中分别加入 3% 的氮酮、薄荷脑、冰片作为促渗剂,以不加任何促渗剂的提取物组为对照组,按“2.2.2”项下方法进行实验,结果见图 1 和表 1。

从图 1 和表 1 可见,战骨提取物中的柚皮素以

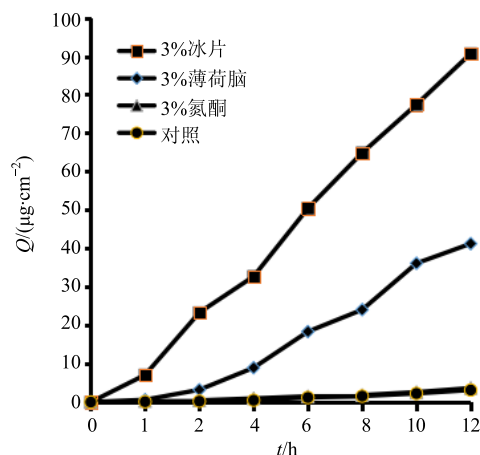


图 1 不同促渗剂对战骨提取物中柚皮素 Q 的影响

Fig 1 Effect of permeation enhancers on cumulative osmosis of naringenin in *P. fulva* extract

表 1 不同促渗剂对战骨提取物中柚皮素的体外透皮吸收动力学参数的影响 ($n=3$)

Table 1 Effect of permeation enhancers on transdermal permeation dynamics of naringenin in *P. fulva* extract ($n=3$)

促渗剂	Q - t 回归方程	r	$J_s/(\text{mg}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1})$	ER
对照	$Q=0.005\ 1\ t-0.007\ 6$	0.975\ 1	0.005\ 1	1.0
3%冰片	$Q=0.139\ 7\ t-0.064\ 0$	0.998\ 6	0.139\ 7**	27.4
3%薄荷脑	$Q=0.072\ 4\ t-0.100\ 4$	0.988\ 8	0.072\ 4**	14.2
3%氮酮	$Q=0.005\ 5\ t-0.005\ 9$	0.977\ 7	0.005\ 5	1.1

与对照组比较: ** $P<0.01$, 下同

** $P<0.01$ vs control group, same as below

零级方式透过皮肤,但含不同促渗剂提取物中的柚皮素 J_s 和 ER 不同。3 种不同促渗剂的用量为 3% 时,对战骨提取物中柚皮素的促渗效果依次为冰片>薄荷脑>氮酮,柚皮素的 J_s 分别是不加促渗剂时的 J_0 的 27.4、14.2、1.1 倍,且冰片和薄荷脑对柚皮素的 J_s 显著高于对照组 ($P<0.01$),又以冰片对柚皮素的促渗效果最佳。因此,可深入考察不同用量的冰片对战骨提取物中柚皮素的透皮吸收影响。

2.2.4 不同用量冰片对柚皮素体外透皮吸收的影响 分别加入 1%、2%、3%、4%、5%、8% 冰片作为促渗剂,以不加任何促渗剂的提取物为空白对照,按“2.2.2”项下方法进行实验,结果见图 2 和表 2。

由图 2 和表 2 可见,战骨提取物中的柚皮素以零级方式透过皮肤,但含不同质量分数促渗剂冰片提取物中的柚皮素 J_s 和 ER 不同。与不加促渗剂的对照组的透皮吸收相比,单独使用冰片作为促渗剂时,随着冰片用量的增大,提取物中柚皮素 12 h 的 Q 和 J_s 呈一定规律增加,但冰片用量增大到 8% 时,

则对柚皮素的透皮吸收产生了明显的抑制作用,但各质量分数冰片对柚皮素的 J_s 均显著高于对照组 ($P<0.01$),又以 5% 冰片对柚皮素的促渗效果最佳。

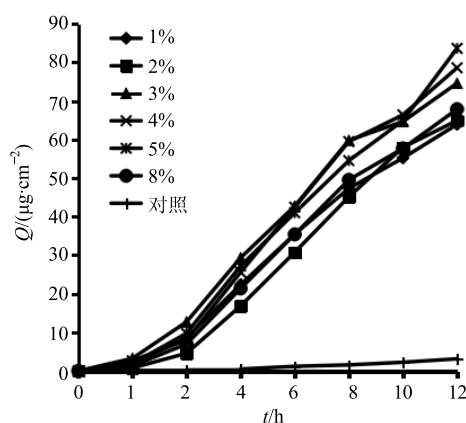


图 2 不同质量分数冰片对战骨提取物中柚皮素 Q 的影响

Fig 2 Effect of different concentration of borneol on cumulative osmosis of naringenin in *P. fulva* extract

表 2 不同浓度冰片对战骨提取物中柚皮素体外透皮吸收动力学参数的影响 ($n=3$)

Table 2 Effect of different concentration of borneol on transdermal permeation dynamics of naringenin in *P. fulva* extract ($n=3$)

促渗剂	Q - t 回归方程	r	$J_s/(\text{mg}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1})$	ER
对照	$Q=0.005\ 1\ t-0.007\ 6$	0.975\ 1	0.005\ 1	1.0
1%冰片	$Q=0.108\ 8\ t-0.099\ 9$	0.995\ 7	0.108\ 8**	21.3
2%冰片	$Q=0.117\ 0\ t-0.152\ 1$	0.992\ 6	0.117\ 0**	22.9
3%冰片	$Q=0.124\ 5\ t-0.087\ 7$	0.991\ 9	0.124\ 5**	24.4
4%冰片	$Q=0.135\ 0\ t-0.135\ 6$	0.992\ 2	0.135\ 0**	26.5
5%冰片	$Q=0.136\ 8\ t-0.142\ 9$	0.997\ 0	0.136\ 8**	26.8
8%冰片	$Q=0.117\ 7\ t-0.127\ 5$	0.995\ 2	0.117\ 7**	23.1

3 讨论

通过查阅相关文献报道^[6-8], 本实验选择了 3 种常用的透皮促渗剂: 氮酮、薄荷脑、冰片, 且这 3 种促渗剂的常用质量分数大都在 1%~5%, 又以 3% 质量分数最为常用, 为了便于在同等条件下比较这 3 种促渗剂的透皮效果, 结合课题组前期的预试验结果, 最终确定选择 3% 的质量浓度来比较不同促渗剂对柚皮素的促渗效果。并根据实验结果进一步考察了不同用量冰片对战骨提取物中柚皮素的经皮吸收的影响。

在同等用量的条件下, 3 种不同促渗剂对战骨提取物中柚皮素透皮吸收影响的实验结果表明, 冰片的促渗作用明显高于其他 2 种促渗剂。许碧莲等^[9]研究发现在完整皮肤中, 冰片明显促进盐酸川芎嗪的透皮吸收, 但去除角质层后, 冰片组与对照组无明显差别, 提示冰片的促渗作用主要在角质层, 可能是改变脂质分子的排列和增加其流动性, 本研究中冰片可大幅提高柚皮素分配和渗透速率, 缩短其时滞, 增加其 Q , 实现快速起效也与促渗机制有关。

课题组后期研究将战骨提取物制备成透皮贴剂, 并根据战骨提取物中柚皮素的经皮给药效果, 考察加入 5%冰片和不加任何促渗剂 2 种处方透皮贴剂的经皮给药效果, 发现柚皮素的透皮结果与本研

究基本一致, 说明采用提取物进行透皮吸收促渗剂筛选的方法完全可行, 后期课题组将考察另一黄酮类成分芹菜素的透皮行为。本研究方法对战骨的新剂型研究开发具有指导和借鉴作用, 实验结果为战骨药材的进一步开发利用提供了理论支撑。

参考文献

- [1] 广西壮族自治区壮药质量标准 (第一卷) [S]. 2008.
- [2] 戴春燕, 陈光英, 朱国元, 等. 战骨茎的化学成分研究 [J]. 中草药, 2007, 38(1): 34-35.
- [3] 陈丽芬. 中药战骨的化学成分、总黄酮提取工艺与抗氧化活性的研究 [D]. 南宁: 广西大学, 2006.
- [4] 王静宇, 杜日建. 一种健骨注射液生产工艺的改进方法: 中国, CN103705652A [P]. 2014-04-09.
- [5] 邓榕榕, 杜冠峰, 许丹华, 等. 3 种促透剂对氨基葡萄糖体外透皮吸收的影响 [J]. 广东化工, 2016, 43(19): 5-6.
- [6] 王 丽, 郑 妮, 方 亮, 等. 渗透促进剂对葶苈提取物中胡椒碱体外经皮吸收的影响 [J]. 沈阳药科大学学报, 2010, 27(1): 20-23.
- [7] 宛 超, 黄明亚. 月桂氮酮的促渗和抑菌作用研究进展 [J]. 中国药房, 2013, 24(13): 1239-1242.
- [8] 银杉杉, 汪艳秋, 周国良, 等. 不同促渗剂对三威跌打风湿贴中柚皮苷体外透皮吸收的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(7): 17-18.
- [9] 许碧莲, 王 晖, 许卫铭. 冰片对盐酸川芎嗪促透作用的研究 [J]. 中成药, 2001, 23(12): 864-867.