

基于经皮微透析的桉油在体促渗活性及其皮肤刺激性评价

王 鹏, 闻铁柱, 康 怡

中国中医科学院眼科医院, 北京 100043

摘要: **目的** 考察桉油作为经皮促渗剂的皮肤刺激性与在体经皮促渗活性, 为其在外用制剂中的合理应用提供数据支持。**方法** 采用 CCK-8 实验测定桉油对人永生表皮细胞 (HaCaT 细胞) 的细胞毒性, 利用皮肤水分流失 (TEWL) 仪测定桉油对大鼠腹皮完整性的影响, 评价其作为经皮促渗剂的皮肤刺激性; 选择川芎嗪和栀子苷为亲脂性和亲水性模型药物, 利用反向渗析法测定微透析探针针对模型药物的在体回收率, 测定在桉油作用下对川芎嗪和栀子苷的皮肤药动学行力的影响。**结果** 桉油对 HaCaT 细胞的半数抑制浓度 (IC_{50}) 为 2.452 mmol/L, 显著高于常用化学促渗剂氮酮的 0.266 mmol/L, 同时桉油作用下对大鼠皮肤 TEWL 值具有一定影响, 但弱于氮酮, 提示桉油可能具有一定皮肤刺激性, 但明显弱于氮酮; 大鼠在体经皮微透析实验显示, 桉油对川芎嗪和栀子苷的经皮促渗倍数 (ER) 分别为 11.40 和 13.79, 提示其对亲脂性和亲水性药物均具有良好的在体促渗效果, 对亲水性药物的促渗作用稍好, 虽然桉油的整体促渗效果弱于氮酮, 但对川芎嗪的促渗倍数与氮酮 ($ER=15.89$) 相接近。**结论** 桉油对亲脂性药物和亲水性药物具有良好的在体经皮促渗效果, 且与化学促渗剂相比, 具有相对温和的皮肤刺激性, 这为其在外用制剂中的应用提供了数据支持。

关键词: 桉油; 皮肤刺激性; 促渗剂; 透皮吸收; 经皮微透析

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)23-5561-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.23.012

In vivo transdermal permeation-enhancement activity and skin irritation of eucalyptus oil by using microdialysis technique

WANG Peng, WEN Tie-zhu, KANG Yi

Eye Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100043, China

Abstract: **Objective** To evaluate the skin irritation of eucalyptus oil and its *in vivo* transdermal penetration enhancement properties by using the cutaneous microdialysis technique. **Methods** The CCK-8 assay was used to measure the toxicity of eucalyptus oil on HaCaT cells, and the TEWL values of the rat skin was determined to investigate the effect of eucalyptus oil on the skin integrity and irritation. Ligustrazine and geniposide were chosen as lipophilic and hydrophilic model drugs, respectively, and their microdialysis probe *in vivo* recoveries were determined using the retrodialysis method. After treatment with eucalyptus oil, the skin pharmacodynamics behaviors of two model drugs were investigated to evaluate its penetration-enhancement activity. **Results** The cytotoxicity test revealed there IC_{50} value of eucalyptus oil to HaCaT cells was 2.452 mmol/L, which was significantly higher than that of chemical penetration enhancer Azone (IC_{50} , 0.266 mmol/L). Meanwhile, the eucalyptus oil had a certain impact on the rat skin TEWL values, but it was weaker than Azone, this implied that the eucalyptus oil had a mild skin irritation. The *in vivo* transdermal microdialysis tests revealed that the enhancement ratios (ER) of ligustrazine and geniposide were 11.40 and 13.79, respectively, indicating that eucalyptus oil could effectively facilitate the transdermal permeation of both of lipophilic and hydrophilic drugs. Although the penetration enhancement property was generally weaker than Azone, the ER value of eucalyptus oil was closely approximate to Azone. **Conclusion** The eucalyptus oil could promote the transdermal permeation of both lipophilic and hydrophilic drugs with mild skin irritation, which provided the data support for its application in topical preparation.

Key words: eucalyptus oil; skin irritation; penetration enhancer; transdermal permeation; transdermal microdialysis

桉油为桃金娘科植物蓝桉 *Eucalyptus globulus* Labill.、樟科植物樟 *Cinnamomum camphora* (L.)

Presl 或上述 2 科同属其他植物经水蒸气提取的挥发油, 味辛、凉。桉油在中药外用制剂中常作为引经

收稿日期: 2018-07-22

基金项目: 中国中医科学院眼科医院院级课题 (201531)

作者简介: 王 鹏, 主管药师, 主要从事中药新剂型与新技术研究。Tel: (010)68688877 E-mail: wangpeng_dr@163.com

药,以促进药物经皮吸收而增强疗效,如《中国药典》2015年版收载的消炎止痛膏、红色正金软膏、正金油软膏等中药外用制剂均含桉油^[1]。现代研究也显示,桉油可作为经皮促渗剂促进药物的透皮吸收^[2-3]。但是,这些研究多采用离体皮肤进行评价,尚缺乏活体皮肤的在体评价,由于皮下血流、酶等均可能影响药物的经皮吸收,仅采用体外透皮实验难以充分了解经皮促渗特征。同时,桉油作为天然来源挥发油成分,多认为具有较高安全性,目前的研究也多集在其促渗活性的评价,尚未有其皮肤安全性的数据支持。因此,本实验拟选择人皮肤细胞和大鼠活体皮肤测定桉油的皮肤刺激性,以川芎嗪和栀子苷为亲脂性和亲水性模型药物,利用经皮微透析技术评价桉油的在体经皮促渗特征,从而为其在外用透皮制剂中的合理应用提供安全性和有效性的数据支持。

1 材料

Agilent 1260 型高效液相色谱仪,美国安捷伦科技有限公司;BS110 型电子分析天平,德国 Sartorius 公司;TM300 型皮肤水份流失测试仪,德国 C&K 公司;Series II 型二氧化碳培养箱、Multiskan GO 型酶标仪,荷兰 Thermo 公司;PHD ULTRA CP 微量注射泵,美国 Harvard Apparatus 公司;CMA 30 型线性微透析探针,截留相对分子质量 6 000,瑞士 CMA 公司。

桉油,批号 20170301,桉油精 70%~85%,江西百草药业有限公司;川芎嗪,批号 16002DEV,质量分数≥98%,Sigma-Aldrich 公司;栀子苷,批号 20161104,质量分数≥98%,百灵威科技有限公司;氮酮,批号 F20160912,国药集团化学试剂有限公司;胎牛血清(批号 NXF0650)、MEM/EBSS 培养基(批号 NYC0742),Fisher 公司;CCK-8 细胞增殖-毒性检测试剂盒,批号 EJ899,日本 Dojindo 公司;甲醇、乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

健康雄性 SD 大鼠,5 周龄,体质量(200±20)g,由北京斯贝福实验动物技术有限公司提供,动物许可证号 SCXK(京)2011-0004;人永生表皮细胞(HaCaT 细胞)购于中国医学科学院基础医学研究所基础医学细胞中心。

2 方法与结果

2.1 皮肤细胞毒性实验

以经典化学促渗剂氮酮为阳性对照,采用 CCK-8 试剂盒对比评价桉油对人永生表皮细胞

(HaCaT)的细胞毒性。收集处于对数期 HaCaT 细胞,以每孔 9 000 的细胞密度接种于 96 孔板中,每孔含完全培养基 100 μL;置于 CO₂ 细胞培养箱内培养 24 h 后,加入系列含 1% DMSO 培养基配制的桉油和氮酮稀释液,并设置 PBS 的空白组和稀释液的对照组,置 CO₂ 培养箱内孵育 24 h;将培养基移去,每孔加入 110 μL 含 10 μL 的 CCK-8 试液培养基,置 CO₂ 培养箱内处理约 2 h;然后用酶标仪在 450 nm 处检测各孔的吸光度(A)值,计算细胞存活率,并采用 SPSS 20.0 软件计算桉油和氮酮的细胞半数抑制浓度(IC₅₀)。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{药物}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

皮肤表皮由 2 类细胞组成,即角朊细胞(即角质形成细胞,约占 95%)和非角朊细胞^[4]。当药物或促渗剂存在一定刺激性或毒性时,与其接触较为紧密的表皮层细胞将会受到不同程度的影响而表现出一定毒性,因此,本实验以 HaCaT 细胞为细胞模型,HaCaT 细胞形态如图 1 所示,通过细胞毒性试验评价天然桉油对细胞活性的影响程度;同时,本实验选择目前广泛采用的化学促渗剂氮酮为阳性对照,对比分析桉油的皮肤刺激性。

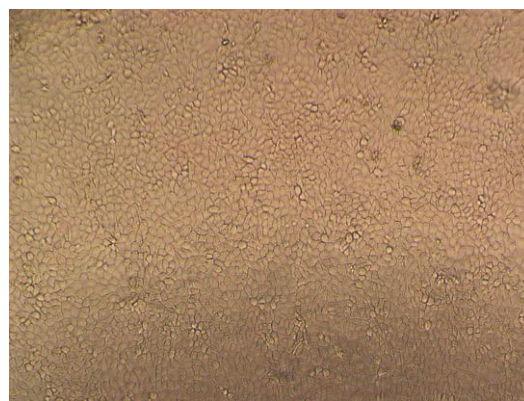


图1 HaCaT 的细胞形态

Fig. 1 Cellular morphology of HaCaT

不同浓度桉油对细胞存活率的影响呈浓度依赖性关系(图2),桉油的 IC₅₀ 为 2.452 mmol/L,而所选择的阳性对照氮酮的 IC₅₀ 值为 0.266 mmol/L,这表明桉油相较于化学促渗剂氮酮,具有更低的皮肤细胞毒性。

2.2 皮肤水分流失(TEWL)实验

取雄性 SD 大鼠,用乌拉坦 ip 麻醉后,小心剃去腹部鼠毛,并在腹部左右各划分约 2 cm² 区域,一侧均匀涂摸由丙二醇-水(65:35)配制的 3% 桉油或氮酮,另一侧则不作任何处理,同时,设立由

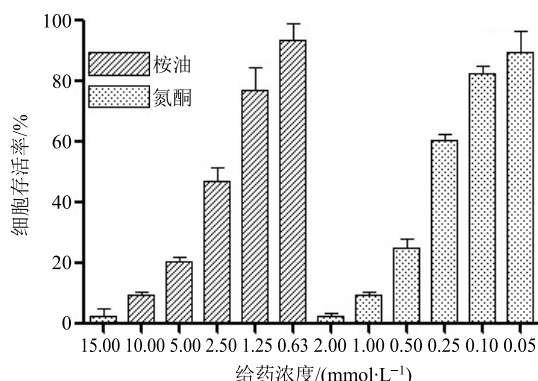


图 2 桉油和氮酮对 HaCaT 细胞存活率的影响

Fig. 2 Effect of eucalyptus oil and Azone on cell viability of HaCaT cells

丙二醇溶液按相同操作处理的对照组；在作用 3 h 后，小心擦去涂抹的促渗剂溶液，并用温水擦洗干净；然后用水分流失测试仪测定促渗剂处理过的皮肤 TEWL 值，由丙二醇溶液处理的另一侧皮肤 TEWL 值作为该组测定基础值，每组平行测定 5 次，在移除促渗剂溶液 8 h 后，再次测定各组皮肤 TEWL 值，检查皮肤完整性恢复情况。然后将皮肤促渗剂处理一侧 TEWL 值减去另一侧的基础值，即为该促渗剂的测定值 (ΔTEWL)，并以对照组计算各促渗剂的皮肤水分流失比率，即 $\text{ER}_{\text{TEWL}} = \Delta\text{TEWL}_{\text{促渗剂}} / \Delta\text{TEWL}_{\text{对照}}$ ，皮肤 8 h 后的水分流失恢复值 (R_{TEWL}) 由按下式计算，即 $R_{\text{TEWL}} = (\Delta\text{TEWL} - \Delta\text{TEWL}_{8\text{h}}) / \Delta\text{TEWL}$ 。

虽然皮肤角质层仅占表皮层 10~20 μm ，但皮肤角质层在限制机体内水分流失方面起最主要的作用，当皮肤表层遭受物理损伤或化学刺激后，能严重影响角质层的屏障作用，因此，TEWL 常作为评价促渗剂皮肤刺激性的一个有效指标^[5-6]。因此，本实验在皮肤细胞毒性实验基础上测定桉油对大鼠皮肤 TEWL 值的影响，进一步评价其皮肤刺激性。

桉油和氮酮对大鼠皮肤 TEWL 的影响如表 1 所

表 1 不同促渗剂对大鼠皮肤 TEWL 值的改变 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)
Table 1 Change of TEWL values rat abdominal skin treated with different penetration enhancers ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

样品	$\Delta\text{TEWL}/$ ($\text{g} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$)	ER_{TEWL}	8 h 后 $\Delta\text{TEWL}/$ ($\text{g} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$)	$R_{\text{TEWL}}/\%$
对照	0.84 ± 0.09	—	0.34 ± 0.04	59.52
桉油	$3.42 \pm 0.77^*$	4.07	$1.45 \pm 0.24^*$	57.60
氮酮	$9.72 \pm 1.07^*$	11.57	$6.01 \pm 1.39^*$	38.17

与对照组比较：* $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group

示，结果表明，相较于氮酮对大鼠皮肤 TEWL 的 11.57 增长倍数，桉油对大鼠皮肤 TEWL 值更弱，但这也提示桉油作为经皮促渗剂对皮肤存在一定程度的刺激性。同时，本实验测定了将大鼠皮肤上的促渗剂移除后的 TEWL 值恢复情况，桉油在经 8 h 后的恢复率为 57.60%，显著高于氮酮的 38.17%，这表明桉油比常用经典促渗剂氮酮具有相对温和的皮肤刺激作用。

2.3 栀子苷 HPLC 方法的建立

色谱条件^[7]：色谱柱采用 Merck Purospher STAR C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm)；流动相为乙腈-水 (20:80)，体积流量为 1 mL/min；检测波长为 240 nm；柱温为 25 $^{\circ}\text{C}$ ；进样量为 20 μL ；栀子苷在该色谱条件下的出峰时间约为 7.4 min，见图 3；微透析液中其他成分对其含量测定无干扰。

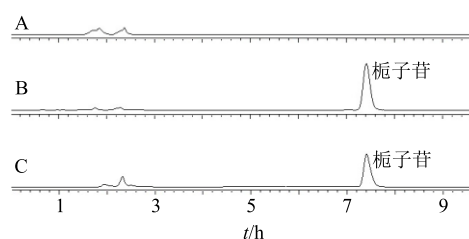


图 3 空白微透析渗透液 (A)、栀子苷对照品溶液 (B) 和微透析实验样品 (C) 的 HPLC 图

Fig. 3 HPLC of blank microdialysis dialysate (A), geniposide standard solution (B), and microdialysis sample solution (C)

精密称取栀子苷适量，用磷酸盐缓冲液（微透析灌注液）配制一系列质量浓度（即 0.1、0.5、1.0、5.0、10.0、20.0 mg/L），考察方法线性关系，结果显示栀子苷在 0.1~20.0 mg/L 线性回归方程为 $Y = 3\,598.2X + 2\,391.7$ ， $r^2 = 0.999\,8$ ，线性关系良好；在线性范围内选择 10.0、1.0、0.1 mg/L 3 个质量浓度作为高、中、低质量浓度样品，每个质量浓度 1 日内连续进样 6 次，计算其日内精密度，高、中、低浓度样品的日内精密度分别为 0.35%、0.14%、0.22%，同时将以上高、中、低质量浓度样品连续 3 d 内进样，计算其日间精密度，高、中、低质量浓度样品的日间精密度分别 2.51%、2.62%、2.59%；用微透析灌注液将栀子苷对照品溶液稀释成 10.0、1.0、0.1 mg/L 3 个高、中、低质量浓度样品，每个质量浓度按色谱条件进样，平行测定 6 次，根据药物峰面积求算的药物测定质量浓度值与药物实际质量浓度值相比即为方法回收率，高、中和低质量浓

度的方法回收率分别为 99.7%、99.1%、98.0%，RSD 值分别为 0.24%、0.87%、2.56%；选择经皮微透析实验中含栀子苷样品溶液（约含 4.5 mg/L）分别于 0、6、12、24、36、48、60、72 h 取样，按色谱条件进样测定，3 日内栀子苷质量分数 RSD 为 0.78%，表明微透析样品稳定，可用于栀子苷的含量测定。

2.4 川芎嗪 HPLC 方法的建立

色谱条件^[8]：色谱柱采用 Diamonsil C₁₈ 色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相为甲醇-水（60：40），体积流量为 1 mL/min；检测波长为 285 nm；柱温为 25 ℃；进样量为 20 μL；川芎嗪在该色谱条件下的出峰时间约为 6.8 min，见图 4；微透析液中其他成分对其含量测定无干扰。

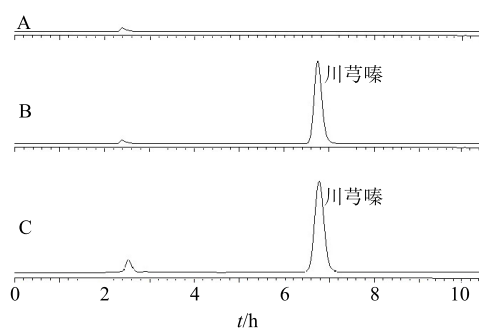


图4 空白微透析渗透液 (A)、川芎嗪对照品溶液 (B) 和微透析实验样品 (C) 的 HPLC 图

Fig. 4 HPLC of blank microdialysis dialysate (A), ligustrazine standard solution (B), and microdialysis sample solution (C)

精密称取川芎嗪适量，用磷酸盐缓冲液配制一系列药物质量浓度（即 0.1、0.5、1.0、5.0、10.0、20.0、50.0 mg/L），考察方法线性关系，结果显示川芎嗪在 0.1~50.0 mg/L 线性回归方程为 $Y=24\ 852.1 X+38\ 169.5$ ， $r^2=1.000\ 0$ ，线性关系良好；在线性范围内选择 20.0、5.0、0.1 mg/L 3 个质量浓度作为高、中、低质量浓度样品，每个质量浓度 1 日内连续进样 6 次，计算其日内精密度，高、中、低质量浓度样品的日内精密度分别为 0.78%、0.97%、0.65%，同时将以上高、中、低质量浓度样品连续进样 3 d，计算其日间精密度，高、中、低质量浓度样品的日间精密度分别为 1.68%、2.01%、1.76%；用微透析灌注液将川芎嗪对照品溶液稀释成高、中、低质量浓度（20.0、5.0、0.1 mg/L）3 个样品，每个质量浓度按色谱条件进样，平行测定 6 次，根据药物峰面积求算的药物测定浓度值与药物实际质量浓度值相比即为方法回收率，高、中和低质量浓度样

品的方法回收率分别为 99.5%、98.6%、97.5%，RSD 值分别为 0.19%、0.18%、1.75%；选择经皮微透析实验中含川芎嗪样品溶液（约含 15.0 mg/L）分别于 0、6、12、24、36、48、60、72 h 取样测定，3 日内川芎嗪含量 RSD 为 0.42%，表明微透析样品稳定，可用于川芎嗪的含量测定。

2.5 反向透析法测定探针回收率

采用浓差法测定微透析探针体外回收率，验证两种模型药物在探针透析膜的正向和反向扩散是否相等，以确定是否可采用反向透析法测定药物的在体回收率^[9-10]。配制系列不同质量浓度栀子苷或川芎嗪药物溶液（0.5、1.0、2.0、5.0、10.0、15.0 mg/L），采用微量泵以 1.0 μL/min 速率对线性探针进行灌注，其中，线性探针半透膜部分浸没于含 2.5 mg/L 药物浓度中，药液置于 32 ℃ 水浴条件下。每 30 分钟收集样品进行含量测定，每次重复收集 3 次。以透析液和灌注液中药物浓度差（即透析液中药物质量浓度净增加量）对灌注液中药物浓度作图，求算直线斜率即为探针的体外回收率。

在探针体外回收率测定基础上，采用反向透析法测定探针对各模型药物的在体回收率。即取雄性 SD 大鼠，用乌拉坦 ip 麻醉后，剃去腹部鼠毛，将微透析线性探针用引导针穿刺入大鼠腹皮下（位于皮下约 2~3 mm 处）；然后用磷酸盐缓冲液配制 1 mg/L 的药物溶液，用微量泵以 1.0 μL/min 速率进行灌注，每 30 分钟收集透析液 1 次，并用建立的测定方法进行含量测定，收集 480 min，根据透析液药物质量浓度和灌注液药物质量浓度，计算探针对药物的在体回收率（R），即 $R=(C_d-C_p)/C_p$ ，其中 C_d 为灌注液药物质量浓度， C_p 为透析液药物质量浓度。

微透析探针回收率（R'）是用于求算皮肤组织中药物浓度的重要参数，其一般定义为 $R'=(C_d-C_p)/(C_m-C_p)$ ，其中 C_d 为透析液中药物质量浓度， C_m 为皮下组织中药物质量浓度， C_p 为灌注液中药物质量浓度。当灌注液中药物质量浓度大于皮下组织中药物质量浓度时，药物则由灌注液进入皮下组织，该条件所测定回收率实际称为传递率，而当皮下组织中药物质量浓度高于灌注液中药物质量浓度时，药物则由皮下组织进入灌注液，此时所求算的回收率才是探针回收率。反向透析法是用一系列含不同药物质量浓度对空白组织进行灌注的微透析实验，所测定的实际为药物在探针中传递率，而探针

传递率和回收率理论上是相等的,这是采用反向透析法测定探针回收率的原理^[11]。但是对某些药物而言探针回收率与传递率并不相等,这需要在采用反向透析法前验证药物的回收率与传递率是否相等。

浓差法^[6]是在采用一系列高于和低于探针周围药物质量浓度的灌注液进行的体外微透析实验,用以验证药物在探针中的回收率与传递率是否相等。川芎嗪和栀子苷的探针体外回收率测定结果见图5。对川芎嗪而言, $C_d - C_p = -0.7115 C_p + 1.7215$, $r^2 = 0.9999$, 直线斜率即体外回收率为0.7115,且直线横轴上方和下方斜率相等,说明探针对川芎嗪的传递率与回收率相等,同时,直线与横轴的交点处的质量浓度为2.42 mg/L,与线性探针半透膜浸没的药物浓度(2.5 mg/L)接近;而栀子苷而言, $C_d - C_p = -0.4740 C_p + 1.2263$, $r^2 = 0.9995$, 直线斜率即体外回收率为0.4740,且直线横轴上方和下方斜率相等,说明探针对栀子苷的传递率与回收率也相等,同时,直线与横轴的交点处的质量浓度为2.59 mg/L,与线性探针半透膜浸没的药物质量浓度(2.5 mg/L)接近,这表明川芎嗪和栀子苷在探针渗析膜间正向和反向的扩散相等,即回收率与传递率相等。

采用反向透析法测定川芎嗪和栀子苷在探针的在体回收率,结果见图6所示,川芎嗪的探针在体回收率在480 min内为(49.43±2.29)%,栀子苷的探针在体回收率在480 min内为(20.35±1.69)%。

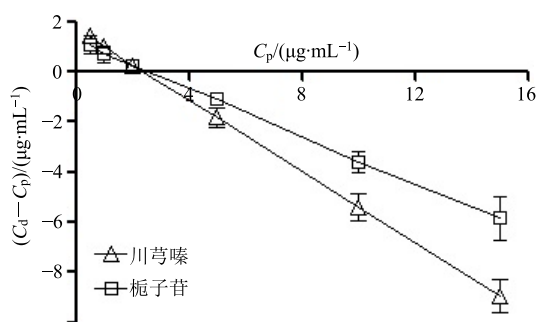


图5 模型药物的探针体外回收率

Fig. 5 *In vitro* microdialysis probe recovery of model drugs

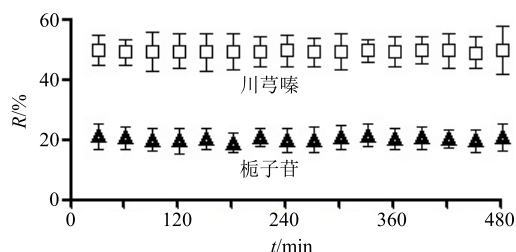


图6 模型药物的R

Fig. 6 *In vivo* microdialysis probe recovery of model drugs

探针在480 min内的在体回收率均稳定。

2.6 大鼠在体经皮微透析实验

按反向透析法将微透析线性探针置于大鼠腹部皮下组织后,采用直径20 mm圆形塑料管,用万能胶小心将其固定于探针半透膜区域上方;然后用磷酸盐缓冲液以1.0 μL/min速率进行灌注,在皮肤上加入由丙二醇-水(65:35)配制含3%桉油或氮酮的饱和川芎嗪或栀子苷溶液(药物质量浓度约为20 mg/mL);从加入药物溶液后每30分钟收集透析液1次,共收集480 min,并按建立的HPLC方法进行含量测定。

根据探针对各模型药物的在体回收率计算药物经皮吸收的真实浓度,同时,按公式计算药物的累积透过量(Q)。

$$Q = \sum_{i=1}^n C_i V_i$$

C_i 为第*i*个时间点的皮下药物浓度, V_i 为取样体积

然后以药物 Q 对时间回归作图,并计算后期达到稳定吸收段(即360~480 min)的直线斜率,即为药物的在体稳态流速,其直线反向延长线与X轴的交点即为滞后时间,促渗剂的在体促渗倍数以药物累积渗透量进行计算,即 $ER = Q_{\text{促渗剂}} / Q_{\text{对照}}$ 。

由于丙二醇-水(65:35)具良好且广泛的溶解性,可溶解不同亲脂性与亲水性模型药物及促渗剂,同时,丙二醇作为化妆品常用润湿剂,丙二醇-水溶液对皮肤表皮结构完整性无明显影响^[12],因此,本实验选择丙二醇-水作为模型药物和促渗剂的溶剂。同时,外用透皮制剂中常用促渗剂多为化学促渗剂氮酮,因此,本实验选择氮酮作为阳性对照,以对比评价桉油的在体经皮促渗效果。

桉油及氮酮对亲脂性药物川芎嗪和亲水性药物栀子苷的在体经皮促渗的药时曲线和 Q -时曲线见图7~10,在体经皮促渗参数见表2,其中,对照组指将模型药物只溶于丙二醇-水系统的给药组。由表可知,大鼠皮肤在桉油作用下,川芎嗪和栀子苷的在体经皮促渗倍数分别为11.40和13.79,表明桉油对亲水性药物和亲脂性药物均具有良好的在体经皮促渗作用,对亲水性药物的促渗效果稍好。而与经典的化学促渗剂氮酮相比,虽然对两种性质模型药物而言,桉油的整体促渗效果相对还弱于氮酮,但是桉油对川芎嗪的促渗倍数与氮酮接近($ER = 15.89$),而对亲水性药物栀子苷则弱于氮酮($ER = 22.35$)。

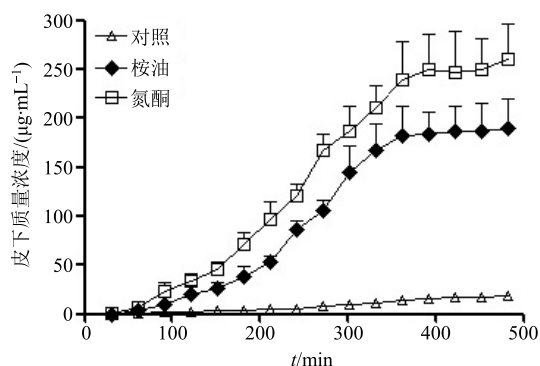


图7 川芎嗪在促渗剂作用下的在体药-时曲线

Fig. 7 Drug concentration-time plots of ligustrazine treated with penetration enhancers

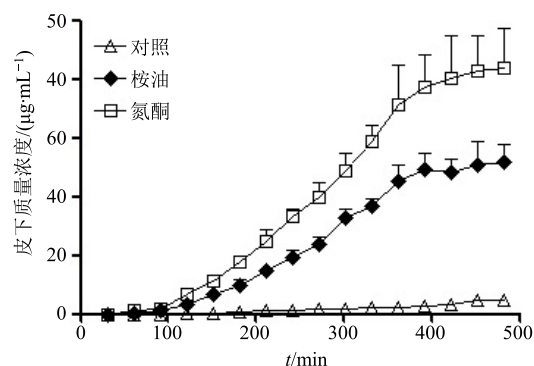


图9 栀子苷在促渗剂作用下的在体药-时曲线

Fig. 9 Drug concentration-time plots of geniposide treated with penetration enhancers

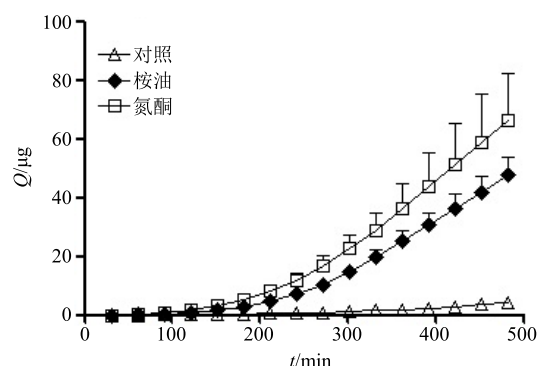


图8 川芎嗪在促渗剂作用下的Q-时曲线

Fig. 8 Cumulative amount-time plots of ligustrazine treated with penetration enhancers

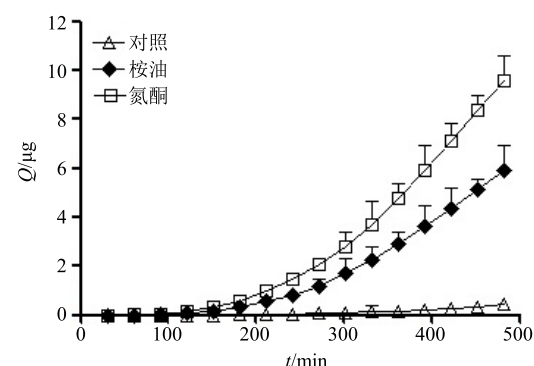


图10 栀子苷在促渗剂作用下的Q-时曲线

Fig. 10 Cumulative amount-time plots of geniposide treated with penetration enhancers

表2 促渗剂作用下模型药物透皮吸收的在体经皮渗透参数 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)Table 2 *in vivo* transdermal parameters of model drugs treated with different penetration enhancers ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

促渗剂	川芎嗪				栀子苷			
	$J_{ss}/(\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1})$	$Q_8/(\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2})$	T_{lag}/h	ER _{Q8}	$J_{ss}/(\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1})$	$Q_8/(\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2})$	T_{lag}/h	ER _{Q8}
对照	0.018 ± 0.002	4.18 ± 0.64	4.09 ± 0.76	—	0.002 ± 0.001	0.43 ± 0.19	4.57 ± 1.13	—
桉油	$0.187 \pm 0.031^*$	$47.67 \pm 8.06^*$	3.75 ± 0.97	11.40	$0.025 \pm 0.006^*$	$5.93 \pm 0.79^*$	4.05 ± 0.91	13.79
氮酮	$0.251 \pm 0.072^*$	$66.41 \pm 10.64^*$	3.60 ± 1.01	15.89	$0.041 \pm 0.011^*$	$9.61 \pm 2.81^*$	4.06 ± 1.14	22.35

与对照组比较: * $P < 0.05$ * $P < 0.05$ vs control group

2.7 数据处理与分析

采用 SPSS 20.0 数理统计软件进行数据分析, 组间差异的比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 讨论

体外的经皮微透析实验中, 分别考察了不同灌注速率对探针微透析回收率的影响, 研究结果表明探针回收率随灌注速率增加呈指数性下降, 灌注速率越低时, 药物在半透膜之间的平衡越充分, 回收率越高, 但过低的灌注速率将导致一定时间内收集

的透析液量不足, 难以有效进行含量测定, 因此, 综合探针回收率和药物含量测定要求, 将经皮微透析实验中灌注速率设为 $1.0 \mu\text{L}/\text{min}$, 同时, 采用不同浓度药物溶液的体外微透析实验中, 所测定的探针传递率均相同, 表明所采用的微透析探针对药物浓度没有依赖性。

通常, 桉油等中药挥发油作为天然的经皮促渗剂, 常被认为安全性高、无毒及无皮肤刺激性, 但是, 经皮促渗剂的作用机制通常会在不同程度上破坏皮肤结构的完整性, 以降低皮肤经皮通透屏障,

从而促进药物透皮吸收,而当皮肤屏障功能受到破坏,将产生一定皮肤刺激性,甚至皮肤毒性。因此,在外用制剂的经皮促渗剂筛选及开发中,除了需要关注其经皮促渗活性外,更需要了解其皮肤刺激性及毒性。虽然桉油作为天然的经皮促渗剂在外用制剂应用较多,但是目前对其皮肤刺激性研究较少,而本研究采用皮肤表皮细胞和大鼠皮肤为模型,从细胞及活性组织层面评价了桉油的皮肤刺激性和毒性,这为其在外用制剂中应用提供了安全性的数据支持。

虽然目前已有相关桉油的经皮促渗活性的研究报道,但是这些研究多采用体外透皮实验进行,尚未有关于桉油在体经皮促渗特征的评价研究,考虑到动物体内环境与离体皮肤模型存在差异,如血流、酶系统等方面对药物经皮吸收的影响^[13],常规的体外透皮实验尚难全面了解其促渗特征。因此,本实验选择川芎嗪和栀子苷作为亲脂性和亲水性模型药物,采用经皮微透析技术较全面地评价桉油对不同性质药物的在体经皮促渗效果,既为该类促渗剂的在体经皮促渗效果的评价提供了方法参考,也为桉油的实际经皮促渗特征提供了数据支持。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 赵茜,李伟泽,程玉钊,等. 几种挥发油对黄藤素透皮给药的促渗作用研究 [J]. 应用化工, 2016, 45(1): 186-189.
- [3] 毛庆祥,常文军,蔡全才. 桉叶油透皮吸收促进剂研究进展 [J]. 药学实践杂志, 2003, 21(4): 205-209.
- [4] 郑俊民. 经皮给药新剂型 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006.
- [5] Kalia Y N, Alberti I, Sekkat N, *et al.* Normalization of stratum corneum barrier function and transepidermal water loss *in vivo* [J]. *Pharm Res*, 2000, 17(9): 1148-1150.
- [6] Fang J Y, Hung C F, Chiu H C, *et al.* Efficacy and irritancy of enhancers on the *in-vitro* and *in-vivo* percutaneous absorption of curcumin [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2003, 55(5): 593-601.
- [7] 高学成,全燕. 冬青油促进蛇床子素和栀子苷透皮吸收的研究 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(7): 1338-1343.
- [8] 沈航孝,徐惠南,沈腾,等. 桉油对川芎嗪透过离体大鼠皮肤的促进作用 [J]. 中国临床药理学杂志, 2006, 15(2): 112-114.
- [9] 丁平田,魏刚,李虹,等. 浓差法用于微透析回收率的测定 [J]. 中国药理学杂志, 2001, 36(10): 690-694.
- [10] 曹岗,邵玉蓝,张云,等. 微透析技术在药动学和药物代谢研究中的应用 [J]. 中草药, 2009, 40(4): 663-666.
- [11] Melgaard L, Hersini K J, Gazerani P, *et al.* Retrodialysis: A review of experimental and clinical applications of reverse microdialysis in the skin [J]. *Skin Pharmacol Physiol*, 2012, 26(3): 160-174.
- [12] Batheja P, Sheihet, L, Kohn J, *et al.* Topical drug delivery by a polymeric nanosphere gel: Formulation optimization and *in vitro* and *in vivo* skin distribution studies [J]. *J Control Release*, 2011, 149(2): 159-167.
- [13] Kreilgaard M. Assessment of cutaneous drug delivery using microdialysis [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2002, 54(S1): s99-s121.