

• 药剂与工艺 •

粗茎秦艽醇提物体外经皮渗透性研究

李春雪¹, 曾锐^{2*}, 高元平², 李源², 杨晓², 马子豪², 严亨秀², 钱妍^{1*}

1. 重庆医科大学附属第二医院药学部, 重庆 400010

2. 西南民族大学药学院, 四川 成都 610041

摘要:目的 建立粗茎秦艽 *Gentiana crassicaulis* 透皮吸收液中多种环烯醚萜类化学成分含量测定方法, 并对粗茎秦艽体外经皮渗透特性进行研究, 为粗茎秦艽经皮给药制剂的研发、临床用药和传统剂型改革提供科学依据。方法 在课题组前期研究的基础上, 采用醇提法制备粗茎秦艽提取液, 选用 3 种常用的透皮促渗剂氮酮、冰片和丙二醇, 利用 HPLC 定量评价单一促渗剂或二元复合促渗剂对粗茎秦艽中马钱苷酸、山梔苷甲酯、獐芽菜苦苷、龙胆苦苷和獐芽菜苷 5 种主要成分的体外经皮渗透特性的影响; 以龙胆苦苷、马钱苷酸和獐芽菜苦苷 3 种成分为评价指标研究粗茎秦艽醇提物在活体小鼠皮肤模型的渗透特性。结果 与对照组相比, 促渗剂的使用可显著增加粗茎秦艽中 5 种主要成分的体外吸收, A (5%氮酮)、B (5%冰片)、C (5%丙二醇)、A+B (2.5%氮酮+2.5%冰片)、A+C (2.5%氮酮+2.5%丙二醇)、B+C (2.5%冰片+2.5%丙二醇) 5 组中马钱苷酸、山梔苷甲酯、獐芽菜苦苷、龙胆苦苷和獐芽菜苷的透皮吸收速率 (J) 分别可达 12.306 0、1.248 8、4.187 5、153.030 0、5.012 6 $\mu\text{g}/(\text{cm}^2\cdot\text{h})$, 促渗效果分别是对照组的 9.73、2.57、13.94、15.92、8.08 倍。其中, A+C 组, 即 2.5%氮酮+2.5%丙二醇组体外促渗效果最为明显。体内经皮渗透实验表明, 与空白组对比, 2.5%氮酮+2.5%丙二醇组对于活体小鼠皮肤的促渗透效果表现较好。结论 氮酮和丙二醇对粗茎秦艽中马钱苷酸、山梔苷甲酯、獐芽菜苦苷、龙胆苦苷和獐芽菜苷 5 种主要成分有良好的促渗透效果, 为研究粗茎秦艽经皮给药制剂质量控制奠定基础。

关键词: 粗茎秦艽; 马钱苷酸; 山梔苷甲酯; 獐牙菜苦苷; 龙胆苦苷; 獐牙菜苷; 氮酮; 冰片; 丙二醇; 促渗剂; 经皮渗透

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)11-2914-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.11.009

Study on transdermal permeation of ethanol extracts from roots of *Gentiana crassicaulis* in vitro and in vivoLI Chun-xue¹, ZENG Rui², GAO Yuan-ping², LI Yuan², YANG Xiao², MA Zi-hao², YAN Heng-xiu², QIAN Yan¹

1. Department of Pharmacy, Seconded Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China

2. School of Pharmacy, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, China

Abstract: Objective To establish a determination method for kinds of chemical components of iridoids in the roots of *Gentiana crassicaulis* in transdermal absorption liquid, and research its transdermal permeability, so as to provide scientific basis for transdermal delivery system, clinical medication and reform of the traditional forms of *G. crassicaulis*. **Methods** Based on the results of the previous investigation, in this paper, using the roots of *G. crassicaulis* as the research subject, a certain concentration solution of *G. crassicaulis* extract was prepared by the alcohol extraction method. Three kinds of common penetration enhancers, azone, borneol and propylene glycol were used. The effects of single penetration enhancer and dual compound penetration enhancers on the transdermal penetration of five kinds of chemical components of loganic acid, shanzhiside methyl ester, swertimarin, gentiopicroside and sweroside *in vitro* and the three kinds of chemical components of gentiopicroside, loganic acid and swertimarin

收稿日期: 2020-02-12

基金项目: 国家重点研发计划 (2017YFC1700705); 四川省留学人员科技活动项目择优资助经费计划 (2018-68); 四川省科技创新苗子工程 (2019059); 西南民族大学中央高校基本科研经费重点项目 (2018NZD16)

作者简介: 李春雪 (1989—), 硕士, 中药师, 主要从事中药基础理论与应用研究。Tel: 18883918709 E-mail: lichunxuelx@126.com

*通信作者 钱妍 (1976—), 副主任药师, 研究方向为临床药学与药事管理。Tel: (023)63693137 E-mail: cqqianyan@hospital.cqmu.edu.cn
曾锐 (1976—), 教授, 主要从事中药制剂炮制研究。Tel: (028)85522099 E-mail: rzeng@swun.edu.cn

in vivo were quantitatively studied by the method of HPLC to investigate the transdermal permeability of *G. crassicaulis* extract in mice skin model. **Results** According to the experimental results, compared to the control group, penetration enhancers significantly increased the absorption of five chemical components of *G. crassicaulis in vitro*. Transdermal absorption rates (J) of loganic acid, shanzhiside methyl ester, swertimarin, gentiopicroside and sweroside were 12.306 0, 1.248 8, 4.187 5, 153.030 0 and 5.012 6 $\mu\text{g}/(\text{cm}^2\cdot\text{h})$, respectively. The transdermal enhancer effects of A (5% azone), B (5% borneol), C (5% propylene glycol), A + B (2.5% azone and 2.5% borneol), A + C (2.5% azone and 2.5% propylene glycol), A + C (2.5% borneol and 2.5% propylene glycol) were 9.73, 2.57, 13.94, 15.92 and 8.08 times faster than the control group, respectively. Among these, the group of A + C had a marked osmotic enhancer effect *in vitro*. In comparison with the control group, the *in vivo* percutaneous penetration test indicated that the dual compound penetration enhancers of 2.5% azone and 2.5% propylene glycol had a marked effect for the permeability enhancement. **Conclusion** This study showed azone and propylene glycol significantly promoted the percutaneous penetration effect of loganic acid, shanzhiside methyl ester, swertimarin, gentiopicroside and sweroside of *G. crassicaulis*, and this study laid a foundation for the quality control of percutaneous drug delivery preparation of *G. crassicaulis*.

Key words: *Gentiana crassicaulis* Duthie ex Burk.; loganic acid; shanzhiside methyl ester; swertimarin; gentiopicroside; sweroside; azone; borneol; propylene glycol; penetration enhancers; transdermal permeation

粗茎秦艽 *Gentiana crassicaulis* Duthie ex Burk. 是龙胆科龙胆属秦艽组植物, 为《中国药典》2015 年版中秦艽的 4 个基原之一, 在我国云南和四川大量种植, 资源稳定丰富^[1-2]。秦艽始载于《神农本草经》, 列为中品, 性味辛、苦、平, 归胃、肝、胆经, 具有祛风湿、清湿热、止痹痛、退虚热的功效, 用于风湿痹痛、中风半身不遂、筋脉拘挛、骨节酸痛、湿热黄疸、骨蒸潮热、小儿疳积发热, 为我国传统医学“抗风湿之要药”^[3]。

秦艽主要成分包括环烯醚萜苷类、木脂素类、黄酮类及三萜类等化学成分^[4]。秦艽中环烯醚萜苷类成分现代研究较为充分, 已证实其为抗风湿活性成分, 代表性成分包括马钱苷酸(loganic acid)、山栀苷甲酯(shanzhiside methyl ester)、獐芽菜苦苷(swertimarin)、龙胆苦苷(gentiopicroside)和獐芽菜苷(sweroside)等, 具有抗炎、镇痛和免疫调节的生物活性。其中马钱苷酸和龙胆苦苷为《中国药典》2015 年版收载的秦艽药材标准含量测定指标。马钱苷酸还具有降压作用^[5]; 山栀苷甲酯有一定的镇痛作用^[6]; 獐芽菜苦苷能使促炎症细胞因子水平降低, 使大鼠足爪肿胀得到抑制, 并能够使抗炎因子水平升高^[7]; 龙胆苦苷具有一定的抗炎镇痛作用, 能提高小鼠痛阈值^[8]; 獐芽菜苷对急性病毒性肝炎具有一定抑制作用^[9]。近年来研究表明, 秦艽醇提物具有调节免疫作用, 为其抗风湿的活性部位^[10]。

局部经皮给药(transdermal drug delivery system, TDDS), 作为一种新型的给药方式, 具有给药次数少、患者依从性高、可避免首关效应, 减少肝脏肾脏等器官的药损, 释药速率稳定且使用方便、安全、可随时中断用药等特点, 近来, 在中药

制剂研究中备受关注。本课题组在前期建立秦艽多组分定性和定量方法的基础上^[11-14], 以粗茎秦艽醇提物中马钱苷酸、山栀苷甲酯、獐芽菜苦苷、龙胆苦苷和獐芽菜苷 5 种环烯醚萜苷类成分作为特征指标成分, 考察粗茎秦艽中有效成分体外经皮给药的效果, 为研究秦艽的经皮给药制剂奠定基础。

1 仪器与材料

粗茎秦艽于 2016 年 10 月采自中国四川省阿坝州黑水县, 经西南民族大学刘圆教授鉴定为粗茎秦艽 *Gentiana crasicaulis* Duthie ex Burk. 的根。

Ultimate 3000 超高效液相色谱系统, 美国戴安公司; ESJ200-4 万分之一电子天平, 沈阳龙腾电子有限公司; BT25S 十万分之一电子天平, 北京赛多利斯科学仪器有限公司; KQ5200E 型超声波清洗器, 昆山超声仪器有限公司; 400Y 型多功能粉碎机, 永康市铂欧五金制品有限公司; 垂直式 Franz 透皮扩散池, 智能透皮实验仪 TP-6 型, 上海谱朗科学仪器有限公司; 对照品龙胆苦苷(批号 110902), 购于四川省维克奇生物科技有限公司; 对照品马钱苷酸(批号 121220)、山栀苷甲酯(批号 120906)、獐芽菜苷(批号 130401)、獐芽菜苦苷(批号 130402), 购于成都普菲德生物技术有限公司; 5 种对照品质量分数均 $\geq 98\%$; 其他分析试剂为成都市科隆化学制品有限公司提供; 用于 HPLC 检测的色谱级试剂为美国 Sigma-Aldrich 公司提供; Milli-Q 净水系统(美国 Millipore 公司)提供超纯水。

SPF 级 SD 大鼠, 雄性, 体质量 180~220 g, 许可证号 SYXK(川)2016-24; 昆明种小鼠, 雄性, 体质量 18~24 g, 许可证号 SCXK(川)2016-11; 大鼠和小鼠均为成都达硕实验动物有限公司提供。

2 方法与结果

2.1 粗茎秦艽样品溶液的制备

取粗茎秦艽药材, 切碎, 然后打粉, 过2号筛。取200 g药材粉装入2 000 mL圆底烧瓶中, 加入1 000 mL乙醇, 回流提取2 h, 滤过, 滤液水浴旋转蒸干, 再加入400 mL乙醇溶解成药材质量浓度为0.5 g/mL的粗茎秦艽样品溶液, 冷藏存放备用, 取一定量用0.45 μm 规格的微孔滤膜滤入进样瓶, 用于HPLC检测。

2.2 HPLC方法的建立

液相条件^[15]: 色谱柱为Waters SunFire C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为0.05%磷酸水溶液-乙腈, 梯度洗脱: 0~15 min, 8%~11%乙腈; 15~18 min, 11%~15%乙腈; 18~23 min, 15%~20%乙腈; 23~30 min, 20%~26%乙腈; 体积流量1 mL/min; 进样体积10 μL ; 柱温30 $^{\circ}\text{C}$ 。马钱苷酸、山栀苷甲酯、獐芽菜苦苷、龙胆苦苷和獐芽菜苷在HPLC图谱中的保留时间分别是13.5、15.7、20.1、23.0、23.6 min(图1)。

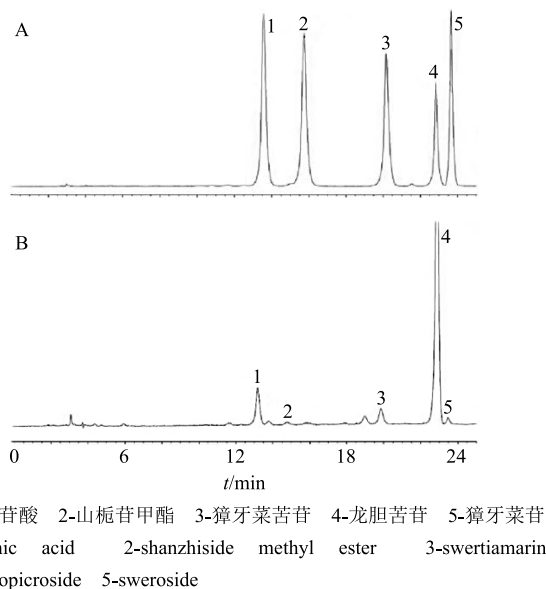


图1 混合对照品溶液(A)和典型透皮接收液(B)的HPLC谱图

Fig. 1 HPLC spectra of mixed reference solution and typical transdermal delivery solution

2.3 方法学考察

精密称量马钱苷酸、山栀苷甲酯、獐芽菜苦苷、龙胆苦苷和獐芽菜苷对照品适量于10 mL量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 配制成质量浓度分别为15.0、5.0、10.0、200.0、5.0 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液。取空白皮肤接收液、混合对照品溶液与粗茎秦艽醇

提物样品溶液进行HPLC检测, 考察方法的专属性; 混合对照品溶液重复进样6次, 以峰面积为指标计算RSD值, 以考察方法的精密度; 粗茎秦艽醇提物样品溶液间隔0、1、2、4、8、12、24 h进样, 以峰面积为指标计算RSD值, 考察样品的日内稳定性; 在已知各成分质量浓度的粗茎秦艽醇提物样品溶液中加入适量混合对照品溶液, 考察方法的平均回收率($n=6$)。结果表明, 空白皮肤接收液中的内源性浸出物不干扰各成分的测定, 方法专属性良好; 马钱苷酸、山栀苷甲酯、獐芽菜苦苷、龙胆苦苷和獐芽菜苷各成分精密度的RSD分别为1.42%、6.50%、3.63%、0.97%、4.51%, 日内稳定性的RSD分别为1.68%、5.96%、4.22%、0.65%、2.72%, 平均回收率分别为99.34%、97.19%、100.40%、100.88%、98.52%, RSD分别为1.75%、7.18%、2.25%、1.43%、5.64%, 均符合分析要求。

2.4 线性关系考察

取混合对照品溶液, 13 000 r/min离心10 min后取上清进行HPLC检测, 以各成分的质量浓度为横坐标(X), 峰面积为纵坐标(Y)进行线性回归, 得回归方程和线性范围, 同时按信噪比(S/N)=10计算各成分的定量限。结果显示马钱苷酸 $Y=12\,682\,776.89X-5\,557.77$, $r=0.999\,2$, 线性范围0.1~15.0 $\mu\text{g/mL}$, 定量限0.08 $\mu\text{g/mL}$; 山栀苷甲酯 $Y=20\,987\,170.25X-6\,121.24$, $r=0.999\,6$, 线性范围0.5~5.0 $\mu\text{g/mL}$, 定量限0.37 $\mu\text{g/mL}$; 獐芽菜苦苷 $Y=14\,095\,919.46X+5\,186.39$, $r=0.999\,4$, 线性范围0.1~10.0 $\mu\text{g/mL}$, 定量限0.08 $\mu\text{g/mL}$; 龙胆苦苷 $Y=7\,997\,633.37X+65\,961.02$, $r=0.999\,3$, 线性范围10~200 $\mu\text{g/mL}$, 定量限1.3 $\mu\text{g/mL}$; 獐芽菜苷 $Y=18\,387\,655.58X+1\,704.40$, $r=0.999\,7$, 线性范围0.5~5.0 $\mu\text{g/mL}$, 定量限0.28 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.5 实验分组

取“2.1”项下制备的粗茎秦艽乙醇提取样品溶液, 加入纯水配成乙醇体积分数为80%的混悬液, 分为6组后加入不同促渗剂, 分别为无促渗剂组(对照组)、5%氮酮组(A组)、5%冰片组(B组)、5%丙二醇组(C组)、2.5%氮酮+2.5%冰片组(A+B组)、2.5%氮酮+2.5%丙二醇组(A+C组)、2.5%冰片+2.5%丙二醇组(B+C组)。

2.6 体外经皮渗透研究

2.6.1 离体大鼠皮肤的处理 取SD大鼠, 用8% Na_2S 溶液对其腹部进行脱毛处理, 再用适量温水对

脱毛区域进行清洁, 正常饲养 24 h 后处死, 小心剪下整块腹部皮肤, 用医用棉球擦拭, 用纯水洗去皮肤下方的脂肪和皮下组织, 用生理盐水洗净, 用锡箔纸包好, 放入 -20°C 的冰箱冷冻保存以备用, 并在 24 h 之内用于体外经皮渗透实验。

2.6.2 体外透皮吸收实验方法 将离体大鼠皮肤浸于 37°C 生理盐水中解冻, 将无菌纱布覆盖在角质层上, 在纱布上滴加含不同促渗剂的粗茎秦艽醇提物样品溶液 0.5 mL, 确保扩散至整个皮肤表面并充分接触 8 h, 除去纱布后用纯水洗净并立即使用^[16], 将大鼠皮肤固定在垂直式 Franz 透皮扩散池上, 经皮渗透面积为 0.78 cm^2 , 接收液体积为 8 mL, 大鼠皮肤的表皮层朝上, 真皮层朝下, 紧密接触事先加入的 20%乙醇接收液, 然后在供给池中加入 1 mL 供给液。水浴槽温度控制在 $(37.0\pm 0.2)^{\circ}\text{C}$, 磁搅拌子转速 200 r/min, 分别于加样后 0、2、4、6、8、10、12 h 从接收池中取 250 μL 接收液作为待测液, 同时补充等量等温的接收液。待测液 13 000 r/min 离心 10 min 后, 取上清液用于分析。

根据 Fick 的第 2 扩散定律计算马钱苷酸、山梔

苷甲酯、獐芽菜苦苷、龙胆苦苷和獐芽菜苷透过大鼠皮肤的经皮渗透量 (Q_t)。在相对稳定的状态下, 计算公式为 $Q_t/A=KLC_0(D/L^2-1/6)$, 其中 A 代表有效扩散面积, C_0 代表药物浓度, K 是药物的油水分配系数, L 为膜的厚度, D 是扩散系数。

渗透速率 (J , 即渗透量随时间变化曲线的斜率) 的计算公式为 $J=C_0KD/L=C_0K_p$, 其中 K_p 为渗透系数。

通过每组样品的 HPLC 检测, 得到不同时间段 (0、2、4、6、8、10、12 h) 的每组样品的透皮吸收量 [Q , $\mu\text{g}/\text{cm}^2$], 结果见表 1~5。以 Q 对不同时间 t 作图, 见图 2, 对作图后直线部分的 Q 对 t 进行线性回归, 所得斜率即为马钱苷酸、山梔苷甲酯、獐芽菜苦苷、龙胆苦苷和獐芽菜苷的渗透速率 [J , $\mu\text{g}/(\text{cm}^2\cdot\text{h})$], 而直线部分反向延长线与 X 轴的交点即为滞后时间 (t_{lag})。为进一步比较促渗剂的促渗效果, 按下列公式计算其经皮促渗倍数 (enhancement ratio, ER) = $J_{\text{含促渗剂}}/J_{\text{对照}}$ 。通过实验, 不含促渗剂时, 山梔苷甲酯与獐芽菜苷在空白组的经皮渗透量低于定量限, 体外渗透速率 (J) 为龙胆

表 1 不同促渗剂对马钱苷酸的体外经皮渗透数据 ($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 1 *In vitro* transdermal permeation data of loganic acid with different penetration enhancers ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	回归方程	r^2	$J/(\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1})$	ER	t_{lag}/h	$Q_{12}/(\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2})$
空白	$Q=1.264\ 4\ t+3.143\ 7$	0.550 2	1.264 4	—	-2.49	10.78 ± 0.87
A	$Q=12.306\ 0\ t+0.446\ 1$	0.885 5	12.306 0	9.73	-0.04	$92.83\pm 2.47^*$
B	$Q=2.167\ 0\ t+1.187\ 6$	0.786 9	2.167 0	1.71	-0.55	17.61 ± 1.01
C	$Q=10.607\ 0\ t-5.701\ 4$	0.977 2	10.607 0	8.39	0.54	$69.25\pm 3.37^*$
A+B	$Q=7.591\ 1\ t+5.773\ 4$	0.732 0	7.591 1	6.00	-0.76	$51.13\pm 6.11^*$
A+C	$Q=9.530\ 5\ t-2.439$	0.921 4	9.530 5	7.54	0.26	$58.51\pm 4.01^*$
B+C	$Q=2.307\ 8\ t+2.817\ 5$	0.738 9	2.307 8	1.82	-1.22	16.60 ± 1.60

与空白组比较: $^*P<0.05$

$^*P<0.05$ vs control group

表 2 不同促渗剂对山梔苷甲酯的体外经皮渗透数据 ($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 2 *In vitro* transdermal permeation data of shanzhiside methyl ester with different penetration enhancers ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	回归方程	r^2	$J/(\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1})$	ER	t_{lag}/h	$Q_{12}/(\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2})$
A	$Q=0.741\ 4\ t+1.416\ 7$	0.628 8	0.741 4	1.53	-1.91	$5.95\pm 0.45^*$
B	$Q=0.596\ 9\ t+1.428\ 2$	0.565 1	0.596 9	1.23	-2.39	4.94 ± 0.39
C	$Q=1.248\ 8\ t+0.994\ 7$	0.814 7	1.248 8	2.57	-0.80	$8.78\pm 0.55^*$
A+B	$Q=0.617\ 9\ t+1.213\ 8$	0.623 7	0.617 9	1.27	-1.96	5.22 ± 0.36
A+C	$Q=0.697\ 6\ t+1.296\ 6$	0.645 5	0.697 6	1.44	-1.82	5.57 ± 0.34
B+C	$Q=0.485\ 4\ t+1.452\ 4$	0.484 8	0.485 4	—	-2.99	4.18 ± 0.33

与 B+C 组比较: $^*P<0.05$

$^*P<0.05$ vs B+C group

表 3 不同促渗剂对獐芽菜苦苷的体外经皮渗透数据 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)Table 3 *In vitro* transdermal permeation data of swertiamarin with different penetration enhancers ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	回归方程	r^2	$J/(\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1})$	ER	t_{lag}/h	$Q_{12}/(\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2})$
空白	$Q=0.300\ 4\ t-0.222\ 2$	0.938\ 4	0.300\ 4	—	0.74	1.72 ± 0.03
A	$Q=3.640\ 3\ t+3.037\ 8$	0.782\ 7	3.640\ 3	12.12	0.83	$29.22 \pm 1.55^*$
B	$Q=0.975\ 2\ t-2.011\ 8$	0.703\ 7	0.975\ 2	3.25	2.06	7.13 ± 0.29
C	$Q=4.002\ 8\ t-3.194\ 6$	0.970\ 3	4.002\ 8	13.23	0.80	$26.19 \pm 1.38^*$
A+B	$Q=2.646\ 6\ t+0.896\ 1$	0.738\ 5	2.646\ 6	8.81	0.34	$16.18 \pm 0.55^*$
A+C	$Q=4.187\ 5\ t-2.119\ 3$	0.904\ 3	4.187\ 5	13.94	0.51	$23.57 \pm 1.57^*$
B+C	$Q=1.034\ 6\ t-1.412\ 2$	0.981\ 3	1.034\ 6	3.44	1.36	5.83 ± 0.44

与空白组比较: $^*P < 0.05$ $^*P < 0.05$ vs control group表 4 不同促渗剂对龙胆苦苷的体外经皮渗透数据 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)Table 4 *In vitro* transdermal permeation data of Gentiopicroside ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	回归方程	r^2	$J/(\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1})$	ER	t_{lag}/h	$Q_{12}/(\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2})$
空白	$Q=9.610\ 3\ t-8.454\ 4$	0.929\ 4	9.610\ 3	—	0.88	60.81 ± 4.02
A	$Q=149.340\ 0\ t-150.18$	0.992\ 6	149.340\ 0	15.54	1.00	$922.71 \pm 37.32^*$
B	$Q=46.941\ 0\ t-85.046$	0.787\ 4	46.941\ 0	4.88	1.81	331.42 ± 14.65
C	$Q=120.650\ 0\ t+98.239$	0.818\ 0	120.650\ 0	12.55	-0.81	$888.61 \pm 22.01^*$
A+B	$Q=95.312\ 0\ t-34.919$	0.904\ 5	95.312\ 0	9.92	0.37	$561.61 \pm 16.38^*$
A+C	$Q=153.030\ 0\ t-101.75$	0.937\ 9	153.030\ 0	15.92	0.66	$866.02 \pm 56.31^*$
B+C	$Q=39.536\ 0\ t-49.915$	0.979\ 8	39.536\ 0	4.11	1.26	237.84 ± 19.54

与空白组比较: $^*P < 0.05$ $^*P < 0.05$ vs control group表 5 不同促渗剂对獐芽菜苷的体外经皮渗透数据 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)Table 5 *In vitro* transdermal permeation data of sweroside with different penetration enhancers ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	回归方程	r^2	$J/(\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1})$	ER	t_{lag}/h	$Q_{12}/(\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2})$
A	$Q=5.012\ 6\ t-3.394\ 4$	0.925\ 0	5.012\ 6	8.08	0.68	$27.86 \pm 2.58^*$
B	$Q=0.732\ 1\ t+1.003\ 3$	0.897\ 6	0.732\ 1	1.18	-1.37	10.78 ± 0.45
C	$Q=4.182\ 7\ t+0.470\ 6$	0.905\ 8	4.182\ 7	6.74	0.11	$28.26 \pm 2.59^*$
A+B	$Q=0.620\ 1\ t+0.890\ 7$	0.801\ 3	0.620\ 1	—	1.44	8.85 ± 0.34
A+C	$Q=3.516\ 5\ t-2.515\ 6$	0.967\ 9	3.516\ 5	5.67	0.72	$20.87 \pm 1.67^*$
B+C	$Q=1.745\ 7\ t+0.340\ 2$	0.786\ 6	1.745\ 7	2.82	0.19	10.59 ± 1.01

与 A+B 比较: $^*P < 0.05$ $^*P < 0.05$ vs A + B group

苦苷>马钱苷酸>獐芽菜苦苷, 分别为 9.610 3、1.264 4、0.300 4 $\mu\text{g}/(\text{cm}^2\cdot\text{h})$ 。因为山梔苷甲酯与獐芽菜苷在空白组的 Q_t 低于定量限, 所以这 2 组以 Q_t 最低的组为对照组。当 12 h 时, 马钱苷酸、山梔苷甲酯、獐芽菜苦苷、龙胆苦苷和獐芽菜苷 5 种成分经皮渗透量 Q_{12} 分别是对照组经皮渗透量的 8.61、2.10、16.99、15.17、5.83 倍, 因而促渗剂的使用可显著增加各成分的经皮渗透量 Q_t 。而以 J 的大小来

判断促渗剂的优劣, 促渗剂的使用可显著增加粗茎秦艽 5 种成分的渗透速率, 马钱苷酸、山梔苷甲酯、獐芽菜苦苷、龙胆苦苷和獐芽菜苷的 J 可达 12.306 0、1.248 8、4.187 5、153.030 0、5.012 6 $\mu\text{g}/(\text{cm}^2\cdot\text{h})$, 分别是, A、C、A+C、A+C、A 组, 促渗速率分别是对照组的 9.73、2.57、13.94、15.92、8.08 倍。其中, A+C 组, 即 2.5%氮酮+2.5%丙二醇体外促渗效果显著。

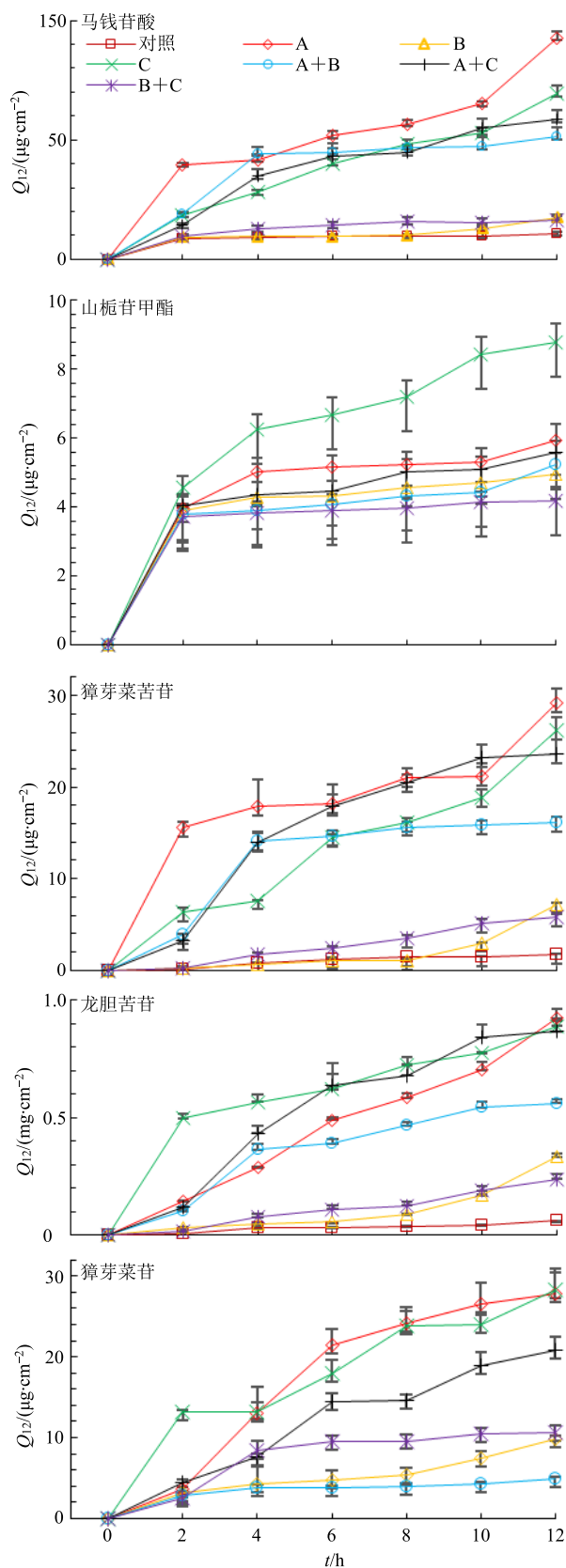


图 2 不同促渗剂对秦艽中 5 种主要成分的体外经皮渗透量-时间曲线

Fig. 2 Percutaneous permeation-time curves of five components of *G. crassicaulis*

2.6.3 体内经皮渗透研究 取昆明种小鼠, 在 20~22 °C、50%~60%相对湿度和 12 h 昼夜更替的相同环境下饲养 1 周, 给予充足的食物和水。实验前 24 h, 除去小鼠背部毛发 (横向×纵向 1.5 cm×2.5 cm), 再小心用生理盐水洗净。根据体外经皮渗透实验结果, 取渗透作用较好的粗茎秦艽醇提物样品溶液, 分别是 A 组、C 组和 A+C 组, 再取空白对照组作为对照。将各组粗茎秦艽醇提物样品溶液 0.4 mL 涂抹在除毛后的小鼠背部, 分别在给药后 3、6、9 h 后脱颈处死, 用直径为 15 mm 的皮钻取下小鼠背部给药部位的皮肤 (1.77 cm²), 用清水洗净, 在洗的同时用医用棉球擦拭掉皮下的血、脂肪和皮下组织, 然后置于 60 °C 热板上持续加热 60 s, 分离开表皮层与真皮层^[17], 剪碎后置于离心管中, 加入 1 mL 水和 200 μL 体积分数为 10% 的高氯酸溶液, 在常温下超声 1 h 后用 4 000 r/min 的速率离心 15 min, 取上清液用 0.45 μm 规格的微孔滤膜滤过后用于 HPLC 检测。

体内实验分析了龙胆苦苷、马钱苷酸和獐芽菜苦苷 3 种秦艽中的主要成分在活体小鼠皮肤中的渗透效果。通过实验, 不同促渗剂组的时间与 Q_t 的关系见图 3。跟空白组对比, 可见 A+C 组, 即 2.5% 氮酮+2.5% 丙二醇促渗剂在体内实验中促渗透效果表现较好。

粗茎秦艽醇提部位体内外经皮吸收实验结果表明, 不同促渗剂组在体内和体外实验中的表现有微小差异, 这有可能是因为氮酮和丙二醇的相互作用在活体皮肤的促渗透效果较离体皮肤明显, 具体作用机制有待研究。

3 讨论

透皮促渗剂能够作用于角质层等皮肤屏障, 具有改善皮肤屏障通透性的功能, 能有效地提高经皮给药制剂中有效成分的经皮渗透率^[18]。本研究在预试验中参考相关文献报道^[19-20]筛选了 10 余种促渗剂。由于化学促渗剂二甲基亚砜、二甲基甲酰胺、二甲基乙酰胺等在有关报道中表现出了一定的毒副作用。目前, 一些研究较多和应用普遍的化学促渗剂包括表面活性剂类、醇类、酯类、亚砷类、脂肪酸与脂肪醇类、氮酮类化合物以及含有挥发性成分的天然促渗剂等^[21]。

在此基础上重点考察了常用的氮酮、丙二醇及冰片 3 种促渗剂对秦艽透皮吸收的影响。目前的研究结果表明, 氮酮有效浓度低、毒性低、无毒副作用

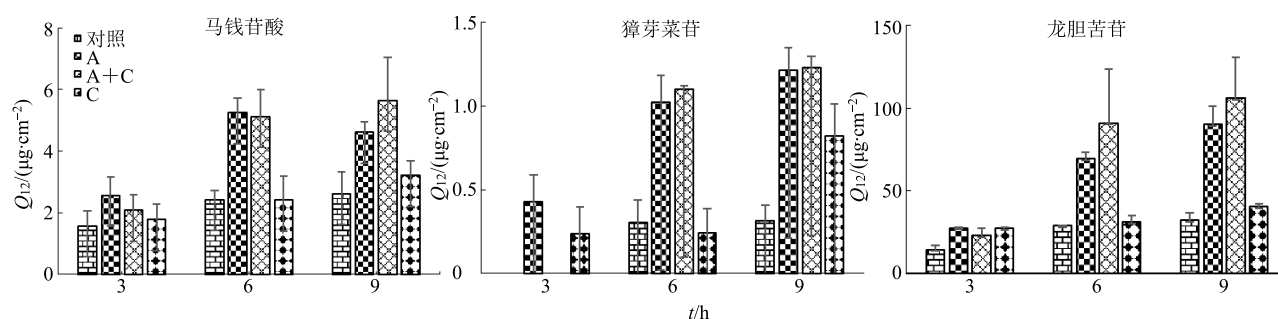


图 3 体内经皮渗透实验数据分析

Fig. 3 *In vivo* transdermal permeation test data analysis

用和性质稳定, 广泛用于透皮吸收制剂的促渗中。因为冰片与薄荷醇的促渗机制相似, 在预试验中比较了冰片和薄荷醇的透皮促渗效果, 结果表明在相同浓度下, 冰片的促渗效果较好, 因此选择冰片进行促渗研究。

预试验中还分别考察了氮酮、丙二醇及冰片不同质量分数时的促渗透的效果。结果发现应用单一促渗剂时, 1%氮酮与 2%氮酮的促渗透能力无显著差异, 5%氮酮促渗能力最强。不同浓度丙二醇的促渗作用并不随着其浓度增加而增加。由于增生性瘢痕皮肤角质细胞脆性高, 表面有许多裂纹, 角质层的屏障功能减弱^[22], 且冰片具有清凉刺激性, 冰片的浓度为 5%较合适。应用二元促渗剂时, 2.5%氮酮+2.5%丙二醇组的促渗能力最强。氮酮进入角质层后可扩大角质层细胞间隙, 提高通过细胞间隙水溶性药物的透过量, 同时, 可对原有的脂质进行重排, 从而增加药物通过角质层的渗透性。丙二醇可增加角质层的水合作用, 提高类脂的流动性, 促进药物的吸收, 但是丙二醇与氮酮联合应用时促渗效果明显强于氮酮或者丙二醇单用的效果^[19]。

提高药物的透皮速率是开发经皮给药制剂的关键, 选择适宜的促渗剂对药物促渗透作用非常重要。由粗茎秦艽醇提部位体外渗透实验结果可知, 促渗剂对粗茎秦艽中马钱苷酸、山梔苷甲酯、獐芽菜苷、龙胆苦苷和獐芽菜苷 5 种主要成分在体外实验中均具有一定的促渗作用, 其中 2.5%氮酮+2.5%丙二醇混合促渗剂促渗作用最佳。但体内经皮渗透试验中发现, 在给药后 3、6、9 h 山梔苷甲酯和獐芽菜苷在小鼠皮肤渗透液中的含量均低于检测限, 故未进行这 2 个指标定量考察。

目前, 对粗茎秦艽有关的经皮给药制剂的研究报道相对较少。本实验筛选了粗茎秦艽醇提部位的透皮促渗剂, 并采用 HPLC 定量考察了促渗剂对秦

艽中多个环烯醚萜类成分的在体内外的促渗透效果, 为粗茎秦艽经皮给药制剂的质量控制提供一定的参考。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 聂燕琼, 李海彦, 孙娜, 等. 粗茎秦艽资源研究进展 [J]. 中国现代中药, 2012, 14(5): 37-40.
- [3] 张红梅, 梁茂新, 范颖, 等. 秦艽潜在功用的考察与分析 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2015, 17(5): 1031-1035.
- [4] 聂安政, 林志健, 王雨, 等. 秦艽化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中草药, 2017, 48(3): 597-608.
- [5] Szumny D, Sozański T, Kucharska A Z, et al. Application of *Cornelian cherry* iridoid-polyphenolic fraction and loganic acid to reduce intraocular pressure [J]. *Evid-Based Compl Alt*, 2015, doi: 10.1155/2015/939402.
- [6] Wei Z, Yang B, Yu Q, et al. 8-O-acetyl shanzhiside methylester from *Lamiophlomis Rotata* reduces neuropathic pain by inhibiting the ERK/TNF- α pathway in spinal astrocytes [J]. *Front Cell Neurosci*, 2018, 12: 1-12.
- [7] Saravanan S, Islam V I H, Babu N P, et al. Swertiamarin attenuates inflammation mediators via modulating NF- κ B/I κ B and JAK2/STAT3 transcription factors in adjuvant induced arthritis [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2014, 56: 70-86.
- [8] Zhang Q, Zhang J, Xia P, et al. Anti-inflammatory activities of gentiopicroside against iNOS and COX-2 targets [J]. *Chin Herb Med*, 2019, 11(1): 108-112.
- [9] 张慧娟, 李菊, 马晓慧, 等. 裂环环烯醚萜苷类化合物的药理作用研究进展 [J]. 药学研究, 2018, 37(11): 659-663.
- [10] Mubashir K, Ganai B A, Ghazanfar K, et al. Anti-inflammatory and immuno-modulatory studies on LC-MS characterised methanol extract of *Gentiana kurroo* Royle [J]. *BMC Compl Altern Med*, 2017, 17(1):

- 1-10.
- [11] 王长生, 董红娇, 包雅婷, 等. UPLC-Q-Exactive 四级杆-静电场轨道阱高分辨质谱联用快速分析粗茎秦艽化学成分 [J]. 中草药, 2016, 47(18): 3175-3180.
- [12] 李源, 高元平, 罗昊, 等. UPLC-Q-Orbitrap HRMS 法同时测定秦艽炮制前后 8 种成分 [J]. 中草药, 2019, 50(12): 2856-2861.
- [13] 陈俊可, 曾锐. 基于 UPLC-ESI-HRMSⁿ 的代谢组学技术对粗茎秦艽不同部位化学成分研究 [J]. 中草药, 2018, 49(10): 2328-2335.
- [14] 徐燕, 李爱暖, 王玥, 等. 基于 UPLC-ESI-HRMSⁿ 评价不同干燥方式对粗茎秦艽中环烯醚萜类及黄酮类成分的影响 [J]. 中草药, 2018, 49(4): 819-825.
- [15] 王爽, 董红娇, 王长生, 等. 不同产地麻花秦艽中 5 种环烯醚萜苷成分的含量比较 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(8): 77-80.
- [16] Gomaa Y A, El-Khordagui L K, Garland M J, *et al.* Effect of microneedle treatment on the skin permeation of a nanoencapsulated dye [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2012, 64(11): 1592-1602.
- [17] Puglia C, Blasi P, Rizza L, *et al.* Lipid nanoparticles for prolonged topical delivery: An *in vitro* and *in vivo* investigation [J]. *Int J Pharm*, 2008, 357(1/2): 295-304.
- [18] 刘志辉, 李俊生, 郑啸, 等. 透皮促渗剂对黄芩总黄酮凝胶膏剂成分体外经皮渗透的影响 [J]. 中草药, 2015, 46(18): 47-55.
- [19] 黄晓晨, 宿树兰, 钱大玮, 等. 不同促渗剂对少腹逐瘀方外用贴剂中效应成分群体外透皮吸收的影响 [J]. 中草药, 2014, 45(21): 3074-3080.
- [20] 黄秋洁, 叶勇, 魏涌标, 等. 战骨提取物中柚皮素透皮吸收促进剂的筛选 [J]. 中草药, 2017, 48(16): 3366-3369.
- [21] Lane M E. Skin penetration enhancers [J]. *Int J Pharm*, 2013, 447(1): 12-21.
- [22] Kunii T, Hirao T, Kikuchi K, *et al.* Stratum corneum lipid profile and maturation pattern of corneocytes in the outermost layer of fresh scars: The presence of immature corneocytes plays a much more important role in the barrier dysfunction than do changes in intercellular lipids [J]. *Br J Dermatol*, 2003, 149(4): 749-756.