

• 药剂与工艺 •

炮制对草乌中乌头类生物碱经皮吸收的影响及其贴剂的设计与评价

王启隆¹, 刘超², 权鹏², 方亮^{2*}, 王延年^{1*}

1. 沈阳药科大学中药学院, 辽宁 沈阳 110000

2. 沈阳药科大学药学院, 辽宁 沈阳 110000

摘要: **目的** 探究炮制对草乌 *Aconiti Kusnezoffii Radix* (AKR) 中 6 种乌头类生物碱 (aconitine alkaloids, AAs) 经皮吸收的影响, 并研制含生草乌和制草乌 *Aconiti Kusnezoffii Radix Cocta* (AKRC) 提取物的压敏胶分散型贴片, 考察其药效差异。**方法** 分别从生、制草乌中提取 AAs, 质量分数分别为 59.3% 和 59.1%。提取出的 AAs 由乌头碱、新乌头碱、次乌头碱、苯甲酰乌头原碱 (BAC)、苯甲酰新乌头原碱 (BMA) 和苯甲酰次乌头原碱 (BHA) 6 种生物碱组成。经过炮制, BAC、BMA 和 BHA 的质量分数分别由 3.8%、9.2%、0.4% 提高至 22.7%、32.9%、2.1%, 而乌头碱、新乌头碱、次乌头碱的质量分数分别由 19.6%、24.3%、2.0% 降低至 0.5%、0.6%、0.3%。采用溶剂挥发法分别制备含有生、制草乌提取物的透皮贴片。在体外透皮实验中, 考察了生、制草乌中 AAs 的经皮渗透性的差异, 并优化贴片处方。最后, 采用弗氏完全佐剂诱导的大鼠慢性炎症模型和醋酸诱导的小鼠扭体模型评价含生、制草乌最佳贴片的抗炎镇痛活性。**结果** BMA 在 6 种 AAs 中表现出最强的经皮渗透性。经过炮制, 制草乌提取物中的 BMA 质量分数由 9.2% 增加到了 32.9%。因此制草乌供给液中 BMA 的 Q_{24} 由 $(2.53 \pm 0.31) \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 提高到了 $(5.51 \pm 0.69) \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($P < 0.05$)。油酸的渗透增强效果最大, 渗透增强比分别为 4.57 (生草乌) 和 9.93 (制草乌)。最佳配方为生或制草乌提取物 (10%)、油酸 (10%)、DURO-TAK[®] 87-4098 (压敏胶基质) 和 Scotchpak[™] 9707 (背衬层)。最优制草乌贴片的 AAs 累积渗透量约为最优生草乌贴片的 2 倍。最佳制草乌透皮贴片较最佳生草乌贴片能显著降低大鼠类风湿性关节炎模型后爪肿胀度和小鼠扭体模型的扭体次数。**结论** 炮制草乌可提高其中 AAs 的皮肤渗透量, 从而提高草乌透皮贴片的镇痛和抗炎作用, 为采用炮制方法提高含草乌透皮贴片功效提供科学依据。

关键词: 草乌; 乌头类生物碱; 经皮渗透; 药效学; 炮制; 贴片; 乌头碱; 新乌头碱; 次乌头碱; 苯甲酰乌头原碱; 苯甲酰新乌头原碱; 苯甲酰次乌头原碱

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)11-3201-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.11.006

Effect of processing on transdermal absorption of alkaloids from *Aconiti Kusnezoffii Radix* and development and evaluation of their patches

WANG Qi-long¹, LIU Chao², QUAN Peng², FANG Liang², WANG Yan-nian¹

1. School of Traditional Chinese Medicine, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110000, China

2. School of Pharmaceutical Sciences, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110000, China

Abstract: Objective To investigate the effect of processing on the transdermal absorption of six aconitine alkaloids (AAs) from *Aconiti Kusnezoffii Radix* (AKR), and develop drug-in-adhesive patches containing AKR and *Aconiti Kusnezoffii Radix Cocta* (AKRC) extract, so as to investigate the differences of their efficacy. **Methods** AAs was severally extracted from AKR and AKRC, and the content of AAs were 59.3% and 59.1%, respectively. The extracted AAs were composed of aconitine, mesaconitine, hypaconitine, benzoylaconine (BAC), benzoylmesaconine (BMA) and benzoylhypaconine (BHA). After processing, the content of

收稿日期: 2021-02-22

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81373367); 国家中医药管理局项目 (201507004-03)

作者简介: 王启隆 (1993—), 男, 辽宁鞍山人, 硕士研究生, 主要从事中药炮制、中药药剂学等研究。

Tel: (024)43520511 E-mail: WQL2372314440@126.com

*通信作者: 方亮, 男, 博士, 教授, 博士生导师。Tel: (024)43520511 E-mail: fangliang2003@yahoo.com

王延年, 男, 博士, 硕士生导师。Tel: (024)43520713 E-mail: 3a4n@sina.com

BAC, BMA and BHA increased from 3.8%, 9.2% and 0.4% to 22.7%, 32.9% and 2.1%, respectively, while the content of aconitine, mesaconitine, and hypaconitine decreased from 19.6%, 24.3% and 2.0% to 0.5%, 0.6% and 0.3%, respectively. Then transdermal patches containing AKR and AKRC extract were prepared by the solvent evaporation technique, respectively. The difference of transdermal permeability of AAs in the AKR and AKRC was investigated and the formulation of the transdermal patch was optimized based on the *in vitro* skin permeation experiment. Finally, the anti-inflammatory and analgesic activity of AKR and AKRC optimal patches were evaluated using complete Freund's adjuvant (CFA)-induced chronic inflammation model of rat and acetic acid-induced writhing model of mice. **Results** BMA exhibited the strongest percutaneous permeability in AAs. After processing, the content of BMA in the AKRC extract increased from 9.2% to 32.9%. Therefore, the Q_{24} of BMA in the donor solution of AKRC was increased from $(2.53 \pm 0.31) \mu\text{g}/\text{cm}^2$ to $(5.51 \pm 0.69) \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($P < 0.05$). Oleic acid showed the maximum permeation enhancement effect with the enhancement ratio values of 4.57 (AKR) and 9.93 (AKRC). The optimal formulation consisted of AKR or AKRC extract (10% of the matrix), oleic acid (10% of the matrix), DURO-TAK® 87-4098 (pressure sensitive adhesive matrix) and Scotchpak™ 9707 (backing layer). Moreover, the cumulative amounts of AAs permeated per unit area in the optimal AKRC extract patch was about 2 times the optimal AKR extract patch. The optimal transdermal patches containing AKRC extract significantly reduced the swelling degree of hind paws and the number of writhing in rheumatoid arthritis rat model and writhing model of mice than the optimal AKR extract patch. **Conclusion** The processing of AKR could improve the skin permeation amount of the AAs, thus improving the analgesic and anti-inflammatory effects of the transdermal patch containing AKR extract, which provides scientific basis for improving the efficacy of the transdermal patch containing AKR extract by processing method.

Key words: *Aconiti Kusnezoffii Radix*; aconitine alkaloids; percutaneous penetration; pharmacodynamics; processing; transdermal patch; aconitine; mesaconitine; hypaconitine; benzoyleaconine; benzoylemesaconine; benzoylehypaconine

草乌是毛茛科植物北乌头 *Aconitum kusnezoffii* Reichb. 的干燥块根。《中国药典》2020 年版记载草乌具有祛风除湿、温经止痛的功能，用于风寒湿痹、关节疼痛、心腹冷痛、寒疝作痛及麻醉止痛等^[1]。乌头碱、新乌头碱、次乌头碱、苯甲酰乌头碱 (BAC)、苯甲酰新乌头碱 (BMA) 和苯甲酰次乌头碱 (BHA) 被认为是草乌中具有主要药理作用的乌头类生物碱 (aconitine alkaloids, AAs)^[2]。因为草乌具有很高的毒性，所以临床上经常将草乌炮制后使用，草乌炮制后毒性较高的双酯型 AAs (乌头碱、次乌头碱、新乌头碱) 水解成毒性较低的单酯型 AAs (BAC、BHA、BMA)，毒性大大降低^[3]。

经皮给药系统 (transdermal drug delivery system, TDDS) 是最适合草乌的给药方案之一。一方面，由于角质层对药物透过皮肤有较高的屏障作用，使药物的经皮渗透量有限，提高了草乌的用药安全性。另一方面，6 种 AAs 注射后半衰期均小于 1 h^[4]，因此能维持血药浓度相对稳定的贴剂，满足草乌的长效镇痛、抗炎作用。而且经皮给药也可减少给药频率，患者可自行给药，提高患者依从性^[5]。以往研究，炮制草乌只是用来减弱其毒性^[6]。但是很少提及炮制对草乌中 6 种 AAs 经皮吸收的影响，以及比较分别含有生、制草乌提取物的贴剂的疗效。压敏胶分散型贴剂是制备工艺简单和生产成本较低的一种贴剂。压敏胶层既发挥贴敷皮肤的作用，又

具有形成药物储库、控制药物释放的作用，适合中药的特点^[7]。本研究分别将生、制草乌提取物制成压敏胶分散型贴剂。通过体外透皮实验，探讨生、制草乌提取物中 6 种 AAs 的透皮行为差异，并优化透皮贴片处方。最后，考察含生、制草乌提取物的最佳贴片抗炎、镇痛效果的差异。

1 材料与仪器

1.1 试剂与药材

生草乌 (批号 170528) 购自安徽亳州中药材市场，经沈阳药科大学中药学院中药炮制与制药研究室主任王延年副教授鉴定为毛茛科植物北乌头 *A. kusnezoffii* Reichb. 的干燥块根。对照品乌头碱 (批号 17110910)、新乌头碱 (批号 17111010)、次乌头碱 (批号 17111310)、BAC (批号 17102610)、BMA (批号 18032406)、BHA (批号 18032807) 购自北京中科质检生物技术有限公司，6 种对照品的质量分数均在 98% 以上。DURO-TAK® 87-2287、87-4098、87-2852，德国汉高公司；ScotchPak™ 9744 防黏层和 Cotran™ 9707 背衬层，美国 3M 公司；油酸，上海麦克林生化有限公司；氮酮，上海阿拉丁试剂有限公司；Transcutol®P (TP)、Labrafil®M 1944 CS (LM)、Plurol®Oleique CC497 (POCC) 和 Capryol™ 90 (CP)，法国 Gattefossé 公司；辛癸酸甘油酯 (glycerol monocaprylocaprate, ODO)，河南郑州河食品科技有限公司；NKA-II 型号大孔吸附树

脂,天津市光复科技发展有限公司;弗氏完全佐剂(complete Freund's adjuvant, CFA),美国 Sigma-Aldrich 公司;双氯芬酸二乙胺贴剂,韩国 Samyang 生物制药有限公司,72 mg/30 cm²。

1.2 实验动物

Wistar 雄性大鼠,体质量 180~220 g; KM 雌性小鼠,体质量 18~22 g;大鼠和小鼠均购自沈阳药科大学实验动物中心。本实验经沈阳药科大学实验动物伦理委员会批准,批准号:No.SYPU-IACUC-C2019-12-14-207 和 No.SYPU-IACUC-C2019-12-20-107。

1.3 仪器

Chromaster 型高效液相色谱仪,日本 Hitachi 公司;TSY-1 多功能扩散仪,沈阳药科大学和延边大学联合研制;Xiang Yi H-2050R 高速台式冷冻离心机,湖南湘仪实验室仪器开发有限公司;AL-104 电子天平,梅特勒-托利多仪器有限公司;FE20 型实验室 pH 计,上海梅特勒-托利多仪器有限公司;CJJ-6 六联磁力搅拌器,上海君竺仪器有限公司;TB-1 实验用框式涂布器,上海锴凯科技贸易有限公司;SZ-96 自动纯水蒸馏器,上海亚荣生化仪器厂;科德士宠物用电推剪,深圳科德士电子厂;Braun3770 贴面剃须刀,博朗上海有限公司。

2 方法与结果

2.1 生草乌的炮制

根据《中国药典》2020 年版方法将生草乌进行炮制^[1]。将生草乌用饮用水冲洗干净,然后用饮用水浸泡 72 h,直至内无白干心。将草乌放入沸水中煮 5 h,切成 2 mm 左右的薄片,放入 40 °C 的烘箱中烘干。

2.2 6 种 AAs 的提取

根据文献方法^[8]分别从生草乌和制草乌中提取 6 种 AAs,用 75% 乙醇分别溶解生草乌和制草乌粉末(10 mL 溶剂:1 g 药材粉末),超声提取 40 min。提取液经大孔吸附树脂柱富集纯化,得到的样品真空干燥。获得的淡黄色粉末经 HPLC 分析。生草乌中乌头碱、次乌头碱和新乌头碱总量为 0.23%,BMA、BAC 和 BHA 的总量为 0.021%。制草乌中 BMA、BAC 和 BHA 的总量为 0.063%,乌头碱、次乌头碱和新乌头碱总量为 0.018%,均符合《中国药典》2020 年版标准。AAs 在经过富集纯化后得到的生草乌提取物粉末和制草乌提取物粉末中的质量分数分别为 59.3%、59.1%。经过炮制,BAC、BMA

和 BHA 的质量分数分别由 3.8%、9.2%、0.4% 提高至 22.7%、32.9%、2.1%,而乌头碱、次乌头碱和新乌头碱的质量分数分别由 19.6%、24.3%、2.0% 降低至 0.5%、0.6%、0.3%。

2.3 压敏胶分散型贴剂的制备工艺

采用溶剂蒸发法分别制备包含生草乌和制草乌提取物的贴片^[9]。将生、制草乌提取物及“2.6.2”项中所选 6 种化学渗透增强剂(油酸、LM、CP、POCC、TP、氮酮,用量均为 10%)分别按质量加入适量乙醇中,室温下与压敏胶搅拌 2 h,得到混合均匀的药物-压敏胶混合物。然后用实验室涂层装置将得到的混合物涂在 ScotchpakTM 9744 防黏层上。将涂好的防黏层在室温下放置 15 min,然后在 50 °C 的烘箱中烘 15 min 以除去溶剂。然后将背衬(ScotchpakTM 9707)覆盖在烘干后的防黏层上。最后将药物-压敏胶层裁剪成 0.95 cm² 进一步使用。

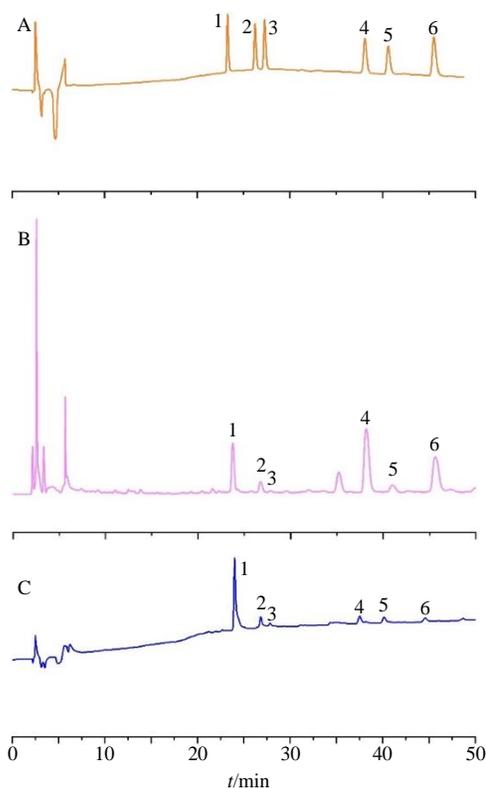
2.4 6 种 AAs 分析方法的建立

2.4.1 色谱条件 色谱柱为 Kromasil C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)。根据《中国药典》2020 年版稍加修改,流动相为乙腈-四氢呋喃(25:15, A)和 0.1 mol/L 醋酸铵(每升纯化水中加入冰醋酸 0.5 mL, B);梯度洗脱条件:0~16 min, 6%~20% A;16~50 min, 20%~25% A;50~60 min, 25%~6% A;体积流量 1 mL/min;柱温 35 °C;进样体积 20 μL;检测波长 235 nm。

2.4.2 线性关系考察 分别精密称取 6 种 AAs 对照品适量,加甲醇制成质量浓度均为 400 μg/mL 的 6 种对照品的母液,分别精密移取 6 种对照品母液各 1 mL 置于同一 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,得混合对照品溶液。

分别精密移取混合对照品溶液 0.10、0.25、0.50、1.00、2.00、4.00 mL 至 100 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,即得混合对照品系列溶液。照“2.4.1”项色谱条件进行 HPLC 检测,见图 1。

以进样质量浓度值为横坐标(X),峰面积值为纵坐标(Y),绘制标准曲线并进行线性回归,得回归方程分别为 BMA $Y=18\ 558 X+545.28$, $R^2=0.999\ 8$, 线性范围 0.42~39.91 μg/mL; BAC $Y=17\ 127 X+3\ 667.9$, $R^2=1.000\ 0$, 线性范围 0.41~41.20 μg/mL; BHA $Y=14\ 691 X+2\ 074.4$, $R^2=0.999\ 9$, 线性范围 0.42~40.20 μg/mL; 新乌头碱 $Y=18\ 914 X-1\ 484.5$, $R^2=0.999\ 8$, 线性范围 0.39~39.10 μg/mL; 次乌头碱 $Y=16\ 612 X+3170$, $R^2=$



1-BMA 2-BAC 3-BHA 4-新乌头碱 5-次乌头碱 6-乌头碱
1-BMA 2-BAC 3-BHA 4-mesaconitine 5-hypaconitine 6-aconitine

图1 6种AAs混合对照品(A)、生草乌样品(B)和制草乌样品(C)的HPLC图

Fig. 1 HPLC of six AAs mixed reference substances (A), AKR sample (B) and AKRC sample (C)

0.999 8, 线性范围 0.41~41.20 $\mu\text{g/mL}$; 乌头碱 $Y=17\,481\,X-639.5$, $R^2=0.999\,6$, 线性范围 0.41~39.60 $\mu\text{g/mL}$; 结果表明 6 种 AAs 在线性范围均呈良好线性关系。本实验所用 HPLC 的检测限为 0.05 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.4.3 精密度试验 配制低、中、高质量浓度 (1.00、5.00、25.00 $\mu\text{g/mL}$) 的由 6 种 AAs 组成的混合对照品溶液。在同 1 d 平行操作 6 次测定 3 种不同质量浓度混合对照品溶液峰面积, 并代入“2.4.2”项中线性回归方程, 求得样品质量浓度, 计算出 RSD, 得到该方法的日内精密度。3 种不同质量浓度混合对照品溶液同法连续测定 3 d, 根据相同的方法计算, 即得到该方法的日间精密度。低、中、高质量浓度样品的日内精密度 RSD 为乌头碱 1.21%、1.75%、1.13%, 次乌头碱 1.25%、1.69%、1.81%, 新乌头碱 1.32%、1.57%、0.89%, BAC 1.28%、1.87%、1.15%, BHA 1.31%、0.75%、1.93%, BMA 1.26%、1.73%、1.29%; 日间精密度 RSD 为乌头碱 1.57%、1.16%、1.36%, 次乌头碱 1.65%、1.88%、1.21%,

新乌头碱 1.42%、1.17%、1.89%, BAC 1.78%、0.67%、1.25%, BHA 1.61%、1.35%、1.83%, BMA 1.86%、1.53%、1.79%。结果表明本实验分析方法日内精密度和日间精密度均达到分析要求 ($RSD < 2\%$)。

2.4.4 稳定性试验 将“2.2”项提取出的生、制草乌溶液分别在提取后的 0、2、4、8、12、24、36、48 h 在“2.4.1”项色谱条件下进样分析, 记录色谱峰面积。生草乌提取液中 6 种 AAs 峰面积 RSD 分别为乌头碱 0.82%、次乌头碱 0.67%、新乌头碱 0.85%、BAC 1.04%、BHA 1.11%、BMA 0.76%。制草乌提取液中 6 种 AAs 峰面积 RSD 分别为乌头碱 1.02%、次乌头碱 0.79%、新乌头碱 0.91%、BAC 1.11%、BHA 1.34%、BMA 1.20%。结果表明生、制草乌提取液中的 6 种 AAs 均在 48 h 内稳定。

2.4.5 重复性试验 分别取“2.2”项下同一时间提取出的生、制草乌溶液 6 份, 按“2.4.1”项色谱条件进行分析, 生草乌提取液中 6 种 AAs 质量分数 RSD 分别为乌头碱 1.01%、次乌头碱 1.15%、新乌头碱 1.22%、BAC 1.38%、BHA 1.21%、BMA 1.36%, 制草乌提取液中 6 种 AAs 质量分数 RSD 分别为乌头碱 0.91%、次乌头碱 1.19%、新乌头碱 0.98%、BAC 1.05%、BHA 0.84%、BMA 0.96%, RSD 均小于 2%, 表明该方法重复性良好。

2.4.6 加样回收率试验 取已知含 5 mg 6 种 AAs 的草乌样品 2 g, 共 9 份, 3 份为 1 组, 分别精密加入含不同质量 (4、5、6 mg) 的 6 种 AAs 混合对照品溶液。按“2.2”项下的超声提取 40 min 操作, 得低、中、高质量浓度供试品溶液, 在“2.4.1”项色谱条件分析测定, 结果见表 1。

2.5 体外经皮透过实验

2.5.1 离体鼠皮的制备和体外透皮实验 参考本课题组前期研究进行透皮实验^[10]。雄性 Wistar 大鼠用 0.20 mg/mL 乌拉坦 iv 麻醉, 用宠物修剪器剃除其腹部的粗毛, 再用剃须刀剃除残余的短毛。在麻醉状态下将大鼠脱颈椎处死后, 立刻用弯剪刀剪下腹部皮肤并去除皮下的脂肪组织。通过显微镜检查皮肤的完整性, 用生理盐水清洗皮肤, $-70\text{ }^\circ\text{C}$ 冷冻保存, 1 周内用完。使用多功能透皮扩散仪 (体积 3.5 mL, 有效扩散面积 1.77 cm^2) 做体外透皮实验。制备的大鼠皮肤夹在供体室和接收室之间, 将皮肤固定在扩散池上, 角质层面向上, 以 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 为接收液, 池内置磁力搅拌子, 转速约 600 r/min, 保持透皮仪内温度恒定为 32 $^\circ\text{C}$ 。在 2、

表1 生草乌和制草乌提取液中乌头碱、次乌头碱、新乌头碱、BAC、BHA 和 BMA 的回收率 (n = 3)

Table 1 Recoveries of aconitine, hyaconitine, mesaconitine, BAC, BHA and BMA in AKR and AKRC extract (n = 3)

成分	生草乌回收率/% (RSD/%)			制草乌回收率/% (RSD/%)		
	低	中	高	低	中	高
乌头碱	95.7 (1.43)	97.1 (1.63)	101.4 (1.23)	93.1 (1.03)	98.5 (1.54)	105.1 (1.42)
次乌头碱	94.3 (1.25)	99.4 (1.77)	99.6 (1.46)	98.4 (1.14)	93.8 (1.49)	99.7 (1.19)
新乌头碱	97.4 (1.11)	99.8 (1.54)	99.1 (1.37)	95.9 (1.26)	98.9 (1.32)	99.6 (1.41)
BAC	96.7 (1.32)	96.2 (1.42)	100.7 (1.43)	99.3 (1.63)	97.6 (1.81)	106.3 (1.55)
BHA	98.1 (1.74)	95.8 (1.68)	103.4 (1.28)	99.2 (1.17)	98.3 (1.38)	112.3 (1.16)
BMA	99.5 (1.56)	98.2 (1.15)	99.2 (1.54)	94.5 (1.49)	95.6 (1.29)	97.9 (1.41)

4、6、8、10、12、24 h 取 2.0 mL 接收液样品后，立即将相同体积的新鲜接收液加入接收室中，以维持室内的漏槽条件。样品在 0 °C、16 000 r/min 离心 7 min，再用 HPLC 法分析上清液。计算药物单位面积累积渗透量 (Q_n)。

$$Q_n = (C_i V + \sum_{i=1}^{n-1} C_{i-1} V_i) / A, \quad i = 2, 4, 6, \dots$$

V 为扩散池的体积 (3.5 mL)， V_i 为每次取样的体积， C_i 和 C_{i-1} 分别为第 i 次和第 $i-1$ 次取样时接收液中的药物质量浓度，A 为有效扩散面积 (0.95 cm²)

2.5.2 生、制草乌中 6 种 AAs 的经皮渗透性差异比较 在本实验中，选择 ODO 作为药物溶剂，因为 ODO 被证实对药物没有经皮渗透增强作用，且溶解度参数接近压敏胶 (pressure-sensitive adhesive) [11]。分别将提取的生、制草乌粉末过饱和溶解在 ODO 中，来探究炮制草乌对其 6 种 AAs 的经皮渗透的影响。结果发现只有 BMA 被检测到，表明 BMA 是 6 种 AAs 中最容易透过皮肤的。此外，BMA 是生草乌和制草乌中最重要的生物活性成分之一。因此，以 BMA 24 h 的 Q_n (Q_{24}) 为指标来筛选最佳处方。制草乌供给液中 BMA 的 Q_{24} (5.51 ± 0.69) $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 显著高于生草乌供给液中 BMA 的 Q_{24} (2.53 ± 0.31) $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($P < 0.05$)。

2.6 生、制草乌贴剂的处方筛选

2.6.1 压敏胶的筛选 由于压敏胶是透皮贴剂的最主要成分之一，在本研究中选择 3 种市售聚丙烯酸酯压敏胶 (DURO-TAK[®] 87-2852、87-4098、87-2287) 进行考察。生、制草乌提取物均与压敏胶以 1:10 的比例混合，分别得到含有 10% 生、制备草乌提取物的混合物。再将得到的混合物制成透皮贴剂。透皮贴片的 Q_{24} 见表 2。结果显示，压敏胶为 DURO-TAK[®] 87-4098 的生、制草乌提取物透皮贴

表2 压敏胶种类筛选结果 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 2 Screening results of pressure-sensitive adhesive type ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

压敏胶	$Q_{24}/(\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2})$	
	生草乌	制草乌
DURO-TAK [®] 87-4098	1.36 ± 0.15	3.20 ± 0.15
DURO-TAK [®] 87-2287	$0.91 \pm 0.11^*$	$2.11 \pm 0.24^*$
DURO-TAK [®] 87-2852	$0.73 \pm 0.10^*$	$1.62 \pm 0.18^*$

与处方 DURO-TAK[®] 87-4098 比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs DURO-TAK[®] 87-4098

片中 BMA 累积渗透量均显著高于 DURO-TAK[®] 87-2287、87-2852。

2.6.2 贴剂中促透剂的筛选 本实验考察了 6 种渗透促进剂 (10%) 对生、制草乌中 BMA 的促透作用。发现油酸对生、制草乌中的 BMA 渗透促进作用均最大，渗透增强比 (ER) 分别为 4.57、9.93。进一步探索油酸用量对生、制草乌提取物中 BMA 皮肤渗透性的影响，结果见表 3。10%、15% 的油酸

表3 渗透促进剂筛选结果 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 3 Screening results of permeation enhancers ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

处方	$Q_{24}/(\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2})$		ER	
	生草乌	制草乌	生草乌	制草乌
10% 油酸	6.21 ± 0.88	31.79 ± 4.38	4.57	9.93
10% LM	3.13 ± 0.46	21.54 ± 1.04	2.30	6.73
10% CP	3.28 ± 0.42	13.23 ± 1.83	2.41	4.13
10% POCC	2.56 ± 0.35	5.34 ± 0.78	1.88	1.67
10% TP	2.33 ± 0.36	4.21 ± 0.57	1.71	1.32
10% 氮酮	1.92 ± 0.26	3.75 ± 0.43	1.41	1.16
空白组	1.36 ± 0.15	3.21 ± 0.16	1.00	1.00
5% 油酸	3.12 ± 0.38	16.86 ± 2.13	2.29	5.27
15% 油酸	6.87 ± 0.79	33.57 ± 4.45	5.05	10.49

用量的 Q_{24} 均明显高于 5% 油酸且 10%、15% 油酸用量的 Q_{24} 无显著性差异。为了减少压敏胶与化学促剂潜在副作用，选择使用 10% 油酸。

ER = 加促进剂的贴剂 Q_{24} / 不加促进剂的贴剂 Q_{24}

2.6.3 贴剂中药物用量的筛选 一般情况下，由于受浓度梯度影响，在透皮贴片中药物的渗透量随着药物用量的增加而增强。在本研究中，发现生、制草乌提取物中 BMA 的皮肤渗透量也随着其用量增加而提高，其中药物用量为 15% 时最高。然而，当生、制草乌提取物用量分别增加到 15% 时，2 个提取物都不能均匀地分散在压敏胶中。因此，将处方中生、制草乌提取物的用量设为 10%。生、制草乌提取物贴片的最优配方见表 4。此外，含有生、制草乌提取物的最优贴片中 6 种 AAs 总量的 Q_{24} 分别为 (20.90 ± 3.25) 、 (42.31 ± 6.47) $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。结果表明，炮制增强了草乌中 6 种 AAs 的总经皮渗透量。

表 4 生、制草乌贴剂的最佳处方

Table 4 Optimal formulation of patches of AKR and AKRC extract

处方	用量
生、制草乌提取物	0.1 g (载药量 10%)
油酸	0.1 g (载药量 10%)
DURO-TAK® 87-4098	1.0 g
Scotchpak™ 9707 作为背衬层	—
ScotchPak™ 9744 作为防黏层	—

2.7 含生、制草乌提取物的透皮贴剂的药效学比较研究

2.7.1 抗炎活性评估 采用 CFA 诱导的大鼠佐剂性关节炎模型来评价本实验透皮贴片的抗炎活性。取雄性 Wistar 大鼠 30 只，随机分为 5 组，每组 6 只。按如下方式处理：(1) 空白对照组：不给予贴剂；(2) 阴性对照组：给予不含药物的空白贴片 (30 cm^2)；(3) 阳性对照组：给予双氯芬酸二乙胺贴片 (6 cm^2 ，含双氯芬酸二乙胺 14.70 mg)；(4) 生草乌贴剂：给予生草乌透皮贴剂 (30 cm^2 ，含 AAs 17.30 mg)；(5) 制草乌贴剂：给予制草乌透皮贴剂 (30 cm^2 ，含 AAs 17.30 mg)。注射 CFA 前测量大鼠双侧后爪的体积作为基线值。空白对照组大鼠的双侧后爪注射生理盐水 0.1 mL，其他组分别注射 CFA 0.1 mL。注射 CFA 后，在 0.5、3、5、7、9、11 d 测量足爪体积。在第 5 天，除空白对照组外，其余组均在大鼠腹部皮肤上贴上对应的透皮贴片，贴敷 7 d。

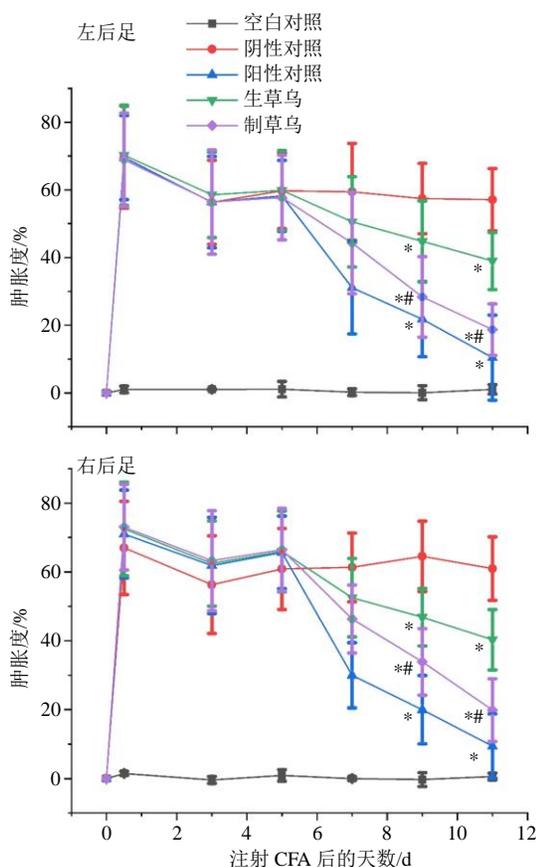
各组大鼠足肿胀度 (S) 按下式计算。

$$S = (V_t - V_n) / V_n$$

其中 V_n 和 V_t 分别是大鼠注射 CFA 前后的足趾体积

贴片的抗炎作用如图 2 所示。虽然这些贴片是应用于非炎症区域的，但是与阴性对照组相比，阳性对照组和实验组在 9 d 和 11 d 仍表现出明显抑制爪肿胀效应 ($P < 0.05$)。此外，制草乌组的抗炎作用明显优于生草乌组 ($P < 0.05$)。各组间两侧后足抑肿程度比较均无统计学差异 ($P > 0.05$)。因此，炮制增强了草乌贴剂的抗炎作用，本研究进一步验证局部应用生、制草乌透皮贴剂后，AAs 主要通过血液循环传递药物至关节组织，从而达到治疗类风湿性关节炎的作用^[12]。

2.7.2 镇痛作用评估 采用小鼠醋酸扭体实验探究生、制草乌贴片的镇痛作用差异。选用体质量在 18~22 g 雄性 KM 小鼠 50 只。在小鼠腹部相同位置剃毛，给药前不麻醉。将小鼠随机分为 5 组，每



与空白对照组比较: * $P < 0.05$; 与生草乌组比较: # $P < 0.05$
* $P < 0.05$ vs blank control group; # $P < 0.05$ vs AKR group

图 2 造模后左、右后足足趾肿胀度变化曲线 ($n = 6$)
Fig. 2 Profiles of swelling degree of left and right feet after CFA injection ($n = 6$)

组 10 只, 按如下处理: (1) 空白对照组: 不给药; (2) 阴性对照组: 给予不含药物的空白贴片 (4.5 cm²); (3) 阳性对照组: 给予双氯芬酸二乙胺贴片 (4.5 cm², 双氯芬酸二乙胺 11.05 mg); (4) 生草乌贴剂组: 给予生草乌透皮贴片 (4.5 cm², AAs 2.6 mg); (5) 制草乌贴剂组: 给予制草乌透皮贴片 (4.5 cm², AAs 2.6 mg)。给药 3 h 后, 去除贴片, 将每只小鼠 ip 0.2 mL 醋酸溶液 (1%) 以引起扭体反应, 并记录 20 min 内的扭体次数 (W), 计算疼痛抑制率来评估止痛效果。一般认为, 疼痛抑制率高于 50%, 表明镇痛制剂是有效的^[13]。如表 5 所示, 生、制草乌组与空白对照组相比均显著减少了扭体次数 ($P < 0.05$)。而且发现制草乌贴剂的镇痛效果比生草乌贴剂更显著 ($P < 0.05$)。结果表明, 炮制增强了草乌贴剂的镇痛作用。

$$\text{疼痛抑制率} = (W_c - W_t) / V_t$$

W_c 和 W_t 分别是空白对照组和实验组的平均扭体次数

表 5 生、制草乌贴剂对醋酸所致疼痛的镇痛作用 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 5 Analgesic effect of AKR patch and AKRC patch on pain induced by acetic acid ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/mg	W	疼痛抑制率/%
空白对照	-	45 ± 10	-
阴性对照	-	40 ± 8	11.8
阳性对照	11.05	8 ± 4*	83.4
生草乌	2.60	18 ± 4*	61.8
制草乌	2.60	6 ± 3*#	87.3

与空白对照组比较: * $P < 0.05$; 与生草乌组比较: # $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs blank control group; # $P < 0.05$ vs AKR group

3 讨论

多年来, 草乌因其显著的药效和不良反应受到人们的关注。更是许多中药处方的主要成分^[14]。乌头碱、HAC 和 MAC 是草乌的主要有毒成分。在之前的研究中仅证明炮制草乌可以降低其毒性^[15]。然而, 炮制草乌是否也能改善其中 6 种主要 AAs 的经皮吸收, 并提高其疗效仍不清楚。在本研究中, 将草乌制成贴片, 使其缓慢和少量地进入体内, 这增加了药物的安全性和药效持续时间。

然而, 以往文献很少提及 AAs 在草乌中的透皮渗透性差异。因为药物在皮肤中的扩散是被动扩散, 依赖于浓度梯度, 而且药物的相对分子质量越小, 越容易渗透到皮肤中^[16]。而 BMA 在生、制草乌中是最丰富的成分之一, 在 AAs 中相对分子质量

仅大于 BHA。因此, 推测 BMA 在 AAs 具有最强的透皮渗透性。通过药物溶液的体外透皮实验证实了此猜想。

本实验考察了贴片中压敏胶种类、化学促透剂种类及其浓度、药物含量对生、制草乌提取物经皮渗透量的影响。其中 DURO-TAK[®] 87-2287 和 DURO-TAK[®] 87-2852 2 个压敏胶均显著低于 DURO-TAK[®] 87-4098 的 Q_{24} 。这可能因为这 2 种压敏胶中的羟基和羧基与 BMA 中的羟基存在氢键相互作用, 使 BMA 从压敏胶中的释放能力降低^[9]。油酸是考察的 6 种化学促透剂中效果最好的, 原因可能是油酸中的羧基与 BMA 的羟基形成氢键, 破坏了 DURO-TAK[®] 87-4098 压敏胶中的酯基与 BMA 的羟基之间的氢键相互作用, 从而促进贴片中的药物释放^[17]。

由于 BMA 呈碱性, 可与油酸形成离子对, 形成了中性分子, 从而增强其经皮渗透性。此外, 油酸可与角质层的细胞间脂质相互作用, 破坏脂质排列, 从而增加细胞间脂质的流动性, 增强药物的经皮渗透能力^[9]。虽然通过溶液系统实验只能检测到 BMA, 但仍需要对最佳贴片中其他 5 种 AAs 的累积透皮量进行测定。

在本实验中, 发现含制草乌提取物最佳贴片中 AAs 的 Q_{24} 约为含生草乌提取物最佳贴片的 2 倍。因为在草乌炮制后, 在本实验所用的扩散池模型中几乎不吸收的毒性 AAs 含量降低, 而在 AAs 中具有最强透皮性 BMA 含量增加, 从而增强了草乌中 AAs 的经皮透过量。因此, 炮制草乌不仅降低了毒性 AAs 的含量, 而且促进了 AAs 的经皮吸收。对于透皮贴片, 药物经皮吸收的结果通常与体内治疗效果密切相关, 活性药物成分累积渗透量越多, 通常治疗效果越好^[18]。因此, AAs 经皮渗透量较高的制草乌贴剂的镇痛和抗炎效果应优于生草乌贴片, 该推论在药效学实验中得到验证。因此, 炮制草乌不仅可以提高其用药安全性, 而且可以提高在皮肤外部使用草乌时的有效性。

本实验制备了分别含有生、制草乌提取物的压敏胶分散型透皮贴片, 显示出良好的镇痛抗炎作用。而且, 发现 BMA 在 AAs 中具有最强的经皮渗透性。因此, 炮制草乌提高了草乌贴片的有效性和安全性。制备的含制草乌提取物的透皮贴片可作为治疗类风湿性关节炎的候选药物。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 236-237.
- [2] 张凌, 柳芳林, 刘长安, 等. HPLC 测定草乌与瓜蒌配伍前后 6 种毒性成分量的变化 [J]. 中草药, 2014, 45(6): 786-790.
- [3] 刘秋雨, 刘晓艳, 侯跃飞, 等. 草乌炮制的历史沿革及外治应用 [J]. 中医外治杂志, 2013, 22(6): 50-52.
- [4] Zhang F, Tang M H, Chen L J, *et al.* Simultaneous quantitation of aconitine, mesaconitine, hypaconitine, benzoylaconine, benzoylmesaconine and benzoylhypaconine in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and pharmacokinetics evaluation of “SHEN-FU” injectable powder [J]. *J Chromatogr B*, 2008, 873(2): 173-179.
- [5] Wiedersberg S, Guy R H. Transdermal drug delivery: 30+ years of war and still fighting! [J]. *J Control Release*, 2014, 190: 150-156.
- [6] 凌珊, 龚千锋. 草乌的研究进展 [J]. 江西中医学院学报, 2011, 23(3): 90-94.
- [7] 方亮, 龙晓英. 药物剂型与递药系统 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2014: 316.
- [8] Liu J, Li Q, Liu R, *et al.* Enrichment and purification of six *Aconitum* alkaloids from *Aconiti Kusnezoffii Radix* by macroporous resins and quantification by HPLC-MS [J]. *J Chromatogr B*, 2014, 960: 174-181.
- [9] Quan P, Jiao B, Shang R, *et al.* Alternative therapy of rheumatoid arthritis with a novel transdermal patch containing *Siegesbeckiae Herba* extract [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 265: 113294.
- [10] Chen Y, Quan P, Liu X C, *et al.* Enhancement of skin permeation of flurbiprofen via its transdermal patches using isopulegol decanoate (ISO-C10) as an absorption enhancer: Pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2015, 67(9): 1232-1239.
- [11] Li N, Quan P, Wan X, *et al.* Mechanistic insights of the enhancement effect of sorbitan monooleate on olanzapine transdermal patch both in release and percutaneous absorption processes [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2017, 107: 138-147.
- [12] Xi H L, Cun D M, Xiang R W, *et al.* Intra-articular drug delivery from an optimized topical patch containing teriflunomide and lornoxicam for rheumatoid arthritis treatment: Does the topical patch really enhance a local treatment? [J]. *J Control Release*, 2013, 169(1/2): 73-81.
- [13] Silva J, Abebe W, Sousa S M, *et al.* Analgesic and anti-inflammatory effects of essential oils of *Eucalyptus* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2003, 89(2/3): 277-283.
- [14] 田璟, 谢雨珂, 孙道磊, 等. 基于网络药理学以三七-草乌为例探讨云南白药胶囊治疗跌打损伤的作用机制 [J]. 川北医学院学报, 2020, 35(6): 965-972.
- [15] 支美汝, 韩舒, 刘凯洋, 等. 生草乌和诃子制草乌细胞毒性及抗炎作用的比较研究 [J]. 中国药房, 2020, 31(22): 2701-2705.
- [16] Liu C, Farah N, Weng W, *et al.* Investigation of the permeation enhancer strategy on benzoylaconitine transdermal patch: The relationship between transdermal enhancement strength and physicochemical properties of permeation enhancer [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2019, 138: 105009.
- [17] Liu N, Song W, Song T, *et al.* Design and evaluation of a novel felbinac transdermal patch: Combining ion-pair and chemical enhancer strategy [J]. *AAPS PharmSciTech*, 2016, 17(2): 262-271.
- [18] Lv S, Quan P, Wang W, *et al.* Two steps modification for improvement of cyclobenzaprine transdermal delivery: Releasing from patch and penetrating through skin [J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2016, 42(12): 2070-2077.

[责任编辑 郑礼胜]