

## • 药剂与工艺 •

## 热性中药挥发油透皮促渗能力与倍半萜角质层贮库效应的相关性研究

祝茜茜<sup>1,2</sup>, 黄森兰<sup>1,2</sup>, 宋芝超<sup>1,2</sup>, 陆姗姗<sup>2,3</sup>, 王裔惟<sup>1,2,4</sup>, 陈 军<sup>1,2,4\*</sup>

1. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023
2. 南京中医药大学 江苏省中医外用开发与应用工程研究中心, 江苏 南京 210023
3. 南京中医药大学翰林学院, 江苏 泰州 225300
4. 南京中医药大学 江苏省中药资源产业化过程协同创新中心, 江苏 南京 210023

**摘要:** **目的** 研究热性中药挥发油影响皮肤屏障功能、发挥透皮促渗作用的主要机制。**方法** 采用水蒸气蒸馏法制备高良姜 *Alpiniae Officinarum Rhizoma*、干姜 *Zingiberis Rhizoma*、胡椒 *Piperis Fructus*、肉桂 *Cinnamomi Cortex*、吴茱萸 *Euodiae Fructus* 5 种热性中药挥发油, 测定相对密度和折光率等理化参数, 利用 GC-MS 分析挥发油的化学成分及经皮给药后倍半萜类成分在皮肤角质层内的驻留行为。以经皮水分流失值 (transepidermal water loss, TEWL) 评价挥发油对大鼠皮肤屏障功能的影响即透皮促渗能力, 采用在体红斑分析考察挥发油的皮肤刺激性, 通过相关性分析考察热性中药挥发油倍半萜角质层贮库效应与其对皮肤屏障功能影响之间的相关性。**结果** 5 种热性中药挥发油均含有一定比例的倍半萜类成分, 经皮给药后能够驻留于角质层中。经皮给药后挥发油能够显著提升大鼠皮肤 TEWL, 其排序为高良姜油 > 干姜油 > 胡椒油 > 肉桂油 > 吴茱萸油, 红斑分析表明热性中药挥发油的皮肤刺激性均显著低于化学促渗剂氮酮, 但不同挥发油之间没有显著性差异。相关性分析结果表明, 倍半萜在角质层驻留能力与其降低皮肤屏障功能显著相关。**结论** 倍半萜角质层贮库效应是热性中药挥发油发挥透皮促渗作用的重要机制, 为诠释经皮外途径下“热者易效”规律提供了依据。

**关键词:** 热性中药; 挥发油; 透皮促渗; 倍半萜; 角质层贮库效应; 高良姜; 干姜; 胡椒; 肉桂; 吴茱萸; 水蒸气蒸馏法; GC-MS; 经皮水分流失; 屏障功能; 在体红斑分析; 皮肤刺激性; 相关性分析; “热者易效”规律

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)23-7742-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.23.016

## Correlation between penetration enhancement ability and stratum corneum reservoir effect of sesquiterpenes of essential oils from traditional Chinese medicine with hot property

ZHU Xi-xi<sup>1,2</sup>, HUANG Sen-lan<sup>1,2</sup>, SONG Zhi-chao<sup>1,2</sup>, LU Shan-shan<sup>2,3</sup>, WANG Yi-wei<sup>1,2,4</sup>, CHEN Jun<sup>1,2,4</sup>

1. School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China
2. Jiangsu Provincial Engineering Research Center of Traditional Chinese Medicine External Medication Development and Application, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China
3. Hanlin College, Nanjing University of Chinese Medicine, Taizhou 225300, China
4. Collaborative Innovation Center for the Industrialization Process of Traditional Chinese Medicine Resources in Jiangsu Province, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

**Abstract: Objective** To study the main mechanism underlying the effects of essential oils (EOs) from traditional Chinese medicine (TCM) with hot property on skin barrier function and penetration enhancement. **Methods** EOs from Gaoliangjiang (*Alpiniae*

收稿日期: 2023-06-04

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (82173994); 江苏省中药资源产业化过程协同创新中心重点项目 (ZDXM-2020-25); 江苏省高校自然科学研究面上项目 (21KJB360020); 江苏省研究生科研与实践创新计划项目 (SJCX22\_0803)

作者简介: 祝茜茜, 硕士研究生。E-mail: zhuxixi07190412@163.com

\*通信作者: 陈 军, 教授, 博士生导师, 主要从事中医外用药物及其制剂研究。

Tel: (025)85811611 E-mail: chenjun75@163.com

*Officinarum Rhizoma*, AOR), Ganjiang (*Zingiberis Rhizoma*, ZR), Hujiao (*Piperis Fructus*, PF), Rougui (*Cinnamomi Cortex*, CC) and Wuzhuyu (*Euodiae Fructus*, EF) with hot nature were prepared by steam distillation. Their relative density and refractive index values were determined, respectively. The chemical composition of EOs and their distribution in the stratum corneum (SC) after dermal administration were analyzed by GC-MS. The transepidermal water loss (TEWL) values were used to evaluate the effect of EOs on the skin barrier function of rats. In addition, the skin irritation potential of EOs was investigated by *in vivo* erythema analysis. The correlation between the SC reservoir effect of sesquiterpenes of EOs and their effect on skin barrier function was investigated by correlation analysis. **Results** The results showed that the EOs from TCM with hot property all contained sesquiterpenes, which could reside in the SC after dermal administration. Then the EOs could significantly reduce skin TEWL values, and the order was as follows: AOR oil > ZR oil > PF oil > CC oil > EF oil. Erythema index analysis showed that the skin irritation of EOs was significantly lower than that of azone, but there was little significant difference among these EOs. The results of correlation analysis showed that the presence of sesquiterpenes in the SC was significantly related to reduced skin barrier function following dermal administration of EOs from TCM with hot property. **Conclusion** The present study indicated that the sesquiterpene SC reservoir effect may be the main mechanism underlying the penetration enhancement effect of the EOs from TCM with hot property, which provides a basis for the interpretation of the law of “higher effect of hot property” via the dermal delivery system.

**Key words:** traditional Chinese medicine with hot property; essential oils; penetration enhancement effect; sesquiterpenes; stratum corneum reservoir effect; *Alpiniae Officinarum Rhizoma*; *Zingiberis Rhizoma*; *Piperis Fructus*; *Cinnamomi Cortex*; *Euodiae Fructus*; steam distillation; GC-MS; transepidermal water loss; skin barrier function; *in vivo* erythema analysis; skin irritation potential; correlation analysis; the law of “higher effect of hot property”

由于皮肤屏障尤其是角质层屏障功能的存在, 中药经皮外用面临的最主要问题就是吸收困难。为了促进药物吸收, 在外用制剂中加入透皮吸收促进剂也就是促渗剂是迄今最常用、最简便的手段。中药挥发油是一大类性质优良的促渗剂, 与化学促渗剂相比, 具有促渗作用强、安全性高、药效协同等优点<sup>[1-3]</sup>。但是中药挥发油品种众多, 所促渗的中药活性成分往往组成比较复杂, 难以像化学药物那样, 通过体外透皮吸收实验比较不同促渗剂的促渗效果来加以遴选。为了有效揭示中药挥发油促渗剂的作用规律, 前期提出了基于药性特征开展中药挥发油透皮促渗规律研究的思路<sup>[4]</sup>, 并且通过系列研究发现: 在辛味的前提下热性中药挥发油透皮促渗能力优于其他“四气”药性中药挥发油, 与清代“外治之宗”吴尚先提出的“热者易效”认识不谋而合<sup>[5]</sup>。

与作为促渗剂应用的其他药性中药挥发油不同, 热性中药挥发油促渗剂均含有一定比例的倍半萜类成分<sup>[5]</sup>。研究表明, 热性中药挥发油经皮外用后, 其所含的单萜类成分如 1,8-桉叶素能够迅速吸收入血<sup>[6]</sup>, 而所含的倍半萜类成分能够在角质层有效驻留(即倍半萜角质层贮库效应)<sup>[7]</sup>。虽然倍半萜类成分的细胞毒性高于单萜类成分, 但驻留在角质层会减少其与皮肤细胞的接触, 因而尽管热性中药挥发油的皮肤细胞毒性显著高于温性中药挥发油, 但由于倍半萜角质层贮库效应的存在, 两者的在体皮肤刺激性却没有显著差异<sup>[7]</sup>。

倍半萜角质层贮库效应已被证明与热性中药挥发油的皮肤安全性相关, 但对于促渗剂而言, 透皮促渗能力可能更加重要, 本实验以 5 种热性中药挥发油促渗剂(高良姜油、干姜油、胡椒油、肉桂油、吴茱萸油)作为研究对象, 考察了其经皮外用后倍半萜类成分在角质层内驻留行为以及采用在体经皮水分流失值(trans epidermal water loss, TEWL)评价的透皮促渗能力, 并对其相关性进行了分析, 以确定倍半萜角质层贮库效应是否同样是热性中药挥发油透皮促渗的重要机制。

## 1 仪器与材料

### 1.1 仪器

BT-25S 型分析天平, 德国赛多利斯科学仪器有限公司; WAY-2S 型阿贝折光仪, 上海精密科学仪器有限公司; BC15K-P1 型高速台式离心机, 英国 Raythan 公司; Agilent 7890B-7010 型气相色谱质谱联用仪, 美国安捷伦公司; Cutometer<sup>®</sup> dual MPA 580 型皮肤性能测试仪, 德国 Courage+Khazaka 公司。

### 1.2 动物

雄性 SD 大鼠, 体质量(220±20)g, 购自北京市维通利华实验动物技术有限公司, 许可证号 SCXK(京)2021-0011。所有动物实验遵循南京中医药大学动物伦理委员会有关实验动物管理和使用的规定, 均符合 3R 原则。

### 1.3 药材

高良姜、干姜、胡椒、肉桂、吴茱萸, 批号分

别为 220106、220112、211214、210103、220104，产地分别为广东、四川、广西、广西、四川，均购自苏州市天灵中药饮片有限公司，以上饮片经南京中医药大学药学院刘圣金教授鉴定，分别为姜科山姜属植物高良姜 *Alpinia officinarum* Hance 的干燥根茎、姜科姜属植物姜 *Zingiber officinale* Rosc. 的干燥根茎、胡椒科胡椒属植物胡椒 *Piper nigrum* L. 的干燥成熟果实、樟科樟属植物肉桂 *Cinnamomum cassia* Presl 的干燥树皮、芸香科吴茱萸属植物吴茱萸 *Euodia rutaecarpa* (Juss.) Benth. 的干燥近成熟果实，均符合《中国药典》2020 年版一部要求。

#### 1.4 药品与试剂

无水硫酸钠，南京化学试剂有限公司；氮酮，批号 C13671210，上海麦克林生化科技有限公司；甲醇，美国天地有限公司；其余试剂均为分析纯，南京化学试剂有限公司。

## 2 方法

### 2.1 热性中药挥发油的制备

称取一定质量的中药饮片，粉碎过筛，置于圆底烧瓶中，加入适量的蒸馏水，加入沸石，连接挥发油提取器和冷凝管，自冷凝管上端加蒸馏水至溢出挥发油提取器支口。浸泡，置电热套中缓缓加热至沸腾，并保持微沸状态一定时间，至提取器中油量不再增加，放置 1 h，读取挥发油体积，并计算挥发油的得率。接收挥发油，经无水硫酸钠干燥，于 4 °C 下避光保存备用。具体工艺参数见表 1。

### 2.2 热性中药挥发油的理化参数测定

**2.2.1 相对密度** 室温下，用进样针精密吸取挥发油 100  $\mu\text{L}$ ，于十万分之一天平精密称定，同法测定 100  $\mu\text{L}$  纯水的质量，则该挥发油在此温度下的相对密度 = 挥发油质量 / 纯水质量。

表 1 热性中药挥发油制备工艺参数

Table 1 Process parameters of essential oils (EOs) from traditional Chinese medicine (TCM) with hot property

中药	粉碎粒度/ 目	提取液倍数/ ( $\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$ )	浸泡 时间/h	沸腾 时间/h
高良姜	24	6	1	5
干姜	10	12	0	6
胡椒	24	5	0	4
吴茱萸	50	8	2	6
肉桂	24	6	2	5

**2.2.2 折光率** 室温下，取适量挥发油，以阿贝折光仪测定其折光率，同法测定纯水的折光率。则挥发油折光率 = 挥发油折光率测定值 + (纯水标准折光率 - 纯水折光率测定值)。

### 2.3 GC-MS 分析热性中药挥发油成分

**2.3.1 供试品溶液的制备** 精密称取挥发油 0.10 g 于 10 mL 量瓶中，用甲醇定容，12 000 r/min 离心（离心半径 10 cm）10 min 后取上清液进行 GC-MS 待测。

**2.3.2 GC-MS 分析条件**<sup>[5]</sup> HP-5MS 色谱柱（5% 苯甲基聚硅氧烷石英毛细管柱，30 m  $\times$  0.25 mm，0.25  $\mu\text{m}$ ）；载气为氦气；体积流量 1 mL/min；离子源为 EI 源；电离能量 70 eV；离子源温度 230 °C；进样口温度 250 °C，进样体积 1  $\mu\text{L}$ ；分流进样。各挥发油的其他具体参数见表 2。采用 NIST11 标准谱库进行检索，采用归一化法计算各类成分的百分含量。

### 2.4 热性中药挥发油经皮外用后角质层内成分分析

大鼠经麻醉后，刀片剃除腹部体毛，温水洗净，自然饲养过夜。促渗剂给予方法参照文献方法<sup>[8]</sup>，于腹部皮肤上分别给予 15  $\mu\text{L}$  挥发油，给药面积为 3.14  $\text{cm}^2$ ，30 min 后用棉签除去剩余挥发油，分别于

表 2 热性中药挥发油 GC-MS 分析条件

Table 2 GC-MS analysis conditions of EOs of TCM with hot property

挥发油	分流比	程序升温	扫描范围 ( $m/z$ )
高良姜油	50 : 1	50 °C，2 °C·min <sup>-1</sup> 到 90 °C，7 °C·min <sup>-1</sup> 到 145 °C 保持 6 min，10 °C·min <sup>-1</sup> 到 250 °C 保持 5 min	30~500
干姜油	50 : 1	45 °C 保持 2 min，5 °C·min <sup>-1</sup> 到 180 °C 保持 10 min，10 °C·min <sup>-1</sup> 到 250 °C 保持 5 min	30~500
肉桂油	40 : 1	100 °C 保持 1 min，5 °C·min <sup>-1</sup> 到 120 °C 保持 3 min，2 °C·min <sup>-1</sup> 到 130 °C，20 °C·min <sup>-1</sup> 到 150 °C 保持 5 min，20 °C·min <sup>-1</sup> 到 200 °C 保持 5 min	50~650
吴茱萸油	50 : 1	50 °C，2 °C·min <sup>-1</sup> 到 90 °C 保持 0 min，10 °C·min <sup>-1</sup> 到 120 °C 保持 5 min，2 °C·min <sup>-1</sup> 到 150 °C 保持 10 min	40~550
胡椒油	50 : 1	50 °C 保持 3 min，3 °C·min <sup>-1</sup> 到 90 °C，10 °C·min <sup>-1</sup> 到 220 °C 保持 5 min	30~550

5、10、30、60、120 min 处死动物剪下给药部位的皮肤，用 Scotch 胶带剥脱皮肤角质层 30 次。将取下的贴片放入洁净干燥的 2 mL 离心管中，加入 1 mL 甲醇溶液，浸泡 6 h 收集浸出液，涡旋，12 000 r/min 离心（离心半径 10 cm）10 min，取上清液进行 GC-MS 分析，分析不同时间点驻留在角质层内的挥发油成分，GC-MS 分析条件同“2.3.2”项下。

### 2.5 热性中药挥发油在体透皮促渗能力评价

采用 TEWL 值的测定评价热性中药挥发油的透皮促渗能力<sup>[9-10]</sup>。大鼠麻醉后刀片剃除腹部体毛，温水洗净，自然饲养过夜。实验设置对照组、高良姜油组、干姜油组、胡椒油组、肉桂油组、吴茱萸油组以及阳性对照氮酮组。利用皮肤性能测试仪的 Tewameter® TM Hex 探头测量所选皮肤区域的 TEWL 值作为初始值；促渗剂给予方法参照文献报道<sup>[8]</sup>，于腹部给药部位皮肤上，分别给予 15  $\mu$ L 挥发油或氮酮，给药面积为 3.14  $\text{cm}^2$ ，作用 30 min 后用棉签除去剩余促渗剂，开始测定不同时间点（5、10、30、60、120 min 及 24 h）的 TEWL 值，计算各个时间段 TEWL 平均值。经挥发油或氮酮处理的大鼠皮肤的水分流失值以  $\Delta\text{TEWL}(\text{g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1})$  表示，其计算方法是将促渗剂擦除后立即测量到的 TEWL 值减去未处理区域的基线值， $R_{\text{TEWL}}$  值为去除促渗剂 24 h 后大鼠皮肤 TEWL 的恢复率<sup>[9]</sup>。

### 2.6 热性中药挥发油在体红斑分析

采用红斑分析评价热性中药挥发油的皮肤刺激性。大鼠麻醉后刀片剃除腹部体毛，温水洗净，自然饲养过夜。实验设置对照组、高良姜油组、干姜油组、胡椒油组、肉桂油组、吴茱萸油组以及氮酮组，每组平行 6 份。利用皮肤性能测试仪的 Colorimeter CL 400 色度探头测量所选皮肤区域的红斑指数（erythema index, EI），在涂抹挥发油或氮酮前测量皮肤  $\text{EI}_0$  值作为初始值。于腹部给药部位皮肤上，分别给予 15  $\mu$ L 挥发油或氮酮，给药面积为 3.14  $\text{cm}^2$ ，30 min 后除去剩余促渗剂，测定不同时间点（5、10、30、60、120、360、600、1440 min）的  $\text{EI}_t$  值。实验结束后计算各个时间段  $\text{EI}_t$  平均值，并与初始值相比即得  $\Delta\text{EI}$  值用于评估透皮促渗剂在体皮肤刺激性。

### 2.7 统计学分析

实验数据采用 SPSS 20.0 统计软件进行统计分析。采用  $\bar{x} \pm s$  表示。计量资料经正态性检验符合正态性分布。以角质层中的倍半萜的峰面积/原油中倍

半萜的峰面积表示倍半萜在角质层贮留的峰面积比例（peak area ratio, PAR），以  $\Delta\text{TEWL}$  表示经热性中药挥发油处理的大鼠皮肤的水分流失值。5 种热性中药挥发油  $\Delta\text{TEWL}$ （5~120 min）的多组间比较采用 One-Way ANOVA 方差分析。在不同时间点热性中药挥发油作用后对皮肤屏障影响的强弱和倍半萜在角质层贮留能力的相关性采用 Pearson 相关系数进行分析，以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 热性中药挥发油理化参数

中药挥发油的理化参数测定结果见表 3。

表 3 热性中药挥发油折光率与相对密度 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )  
Table 3 Refractive index and relative density of EOs from TCM with hot property ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

热性中药挥发油	折光率/nD	相对密度	得率/%
高良姜油	1.478 0	0.911 2 $\pm$ 0.002 1	0.75
干姜油	1.492 0	0.876 2 $\pm$ 0.002 8	2.00
胡椒油	1.482 8	0.872 7 $\pm$ 0.001 2	1.25
吴茱萸油	1.484 7	0.865 0 $\pm$ 0.002 6	0.37
肉桂油	1.582 0	0.979 2 $\pm$ 0.001 5	3.80

### 3.2 热性中药挥发油 GC-MS 成分分析

5 种热性中药挥发油的成分分析结果见图 1。可见，热性中药挥发油除肉桂油外主要含有萜类成分，即单萜类和倍半萜类成分，而肉桂油主要含芳香族类和倍半萜类成分。倍半萜类成分是热性中药挥发油的共性成分。

### 3.3 热性中药挥发油外用后倍半萜角质层贮库效应评价

5 种热性中药挥发油及其在体经皮外用后角质层内挥发性成分 GC-MS 总离子流图见图 2~6。可见单萜类或芳香族类成分在角质层中驻留时间较短，如高良姜油和肉桂油在经皮外用 5、10 min 后能检出单萜类或芳香族类成分；而倍半萜类成分驻留能力相对较强，高良姜油、干姜油、胡椒油经皮外用 120 min 后角质层内仍能检出倍半萜类成分，吴茱萸油和肉桂油经皮外用后 60 min 角质层内仍能检出倍半萜类成分，即相对于单萜与芳香族类成分，热性中药挥发油的倍半萜角质层贮库效应比较显著。

某些倍半萜类成分在角质层内驻留比较明显。如氧化石竹烯是 5 种热性中药挥发油的共性倍半萜类成分，且在原油中相对含量均低于 5%，但在应用

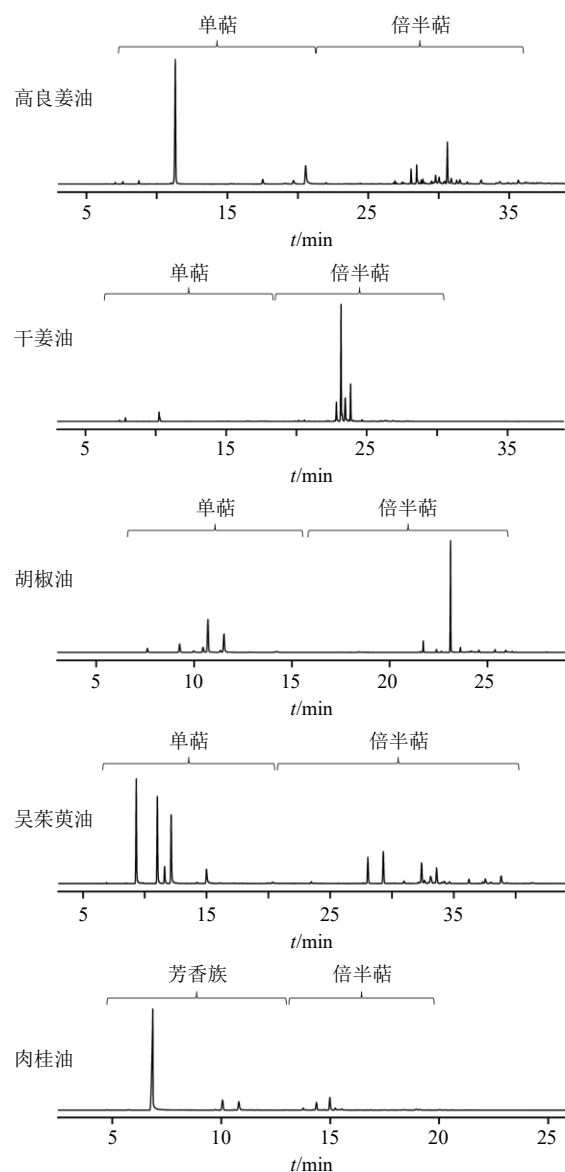
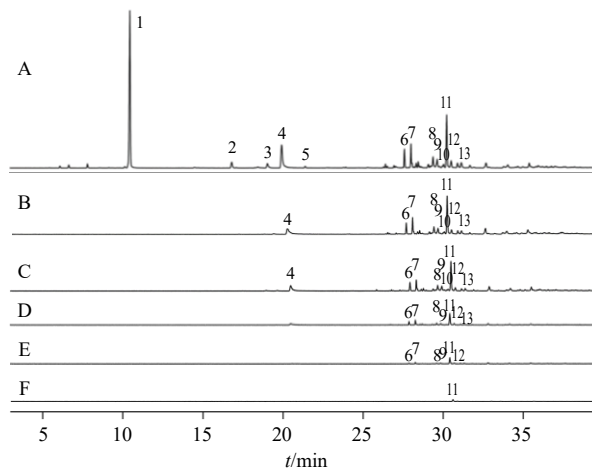


图1 热性中药挥发油的GC-MS总离子流图

Fig. 1 GC-MS total ion chromatogram of EOs from TCM with hot property

胡椒油和吴茱萸油 60 min 后的角质层仍能检测出氧化石竹烯；β-石竹烯为胡椒油、吴茱萸油和高良姜油的共性倍半萜类成分，上述 3 种热性中药挥发油经皮外用 60 min 后的角质层中仍能检出，在胡椒油经皮外用 120 min 后仍能检出。

为了定量表征倍半萜的角质层驻留行为，同时为了消除不同挥发油含有倍半萜类成分初始比例不同的影响，将不同时间点测得的角质层内倍半萜类成分总峰面积与原油倍半萜类总峰面积相比计算比例，如表 4 所示，可见 5 种热性中药挥发油的倍半萜类成分具有较好的角质层驻留能力，并且以高良姜油和干姜油最为显著。



A-高良姜油原油；B~F-除去挥发油后 5、10、30、60、120 min 的角质层 1-1,8-桉叶素 2-樟脑 3-4-萜品醇 4-α-萜品醇 5-异丁酸苯乙酯 6-β-石竹烯 7-α-佛手柑油烯 8-β-瑟林烯 9-巴伦西亚橘烯 10-金合欢烯 11-α-衣兰油烯 12-δ-杜松烯 13-蛇床-3,7(11)-二烯

A-AOR oil B~F-stratum corneum of 5, 10, 30, 60, 120 min after removing EOs 1-eucalyptol 2-camphor 3-terpinen-4-ol 4-α-terpineol 5-phenethyl isobutyrate 6-β-caryophyllene 7-α-bergamotene 8-β-selinene 9-valencene 10-farnesene 11-γ-cadinene 12-δ-cadinene 13-selina-3,7(11)-diene

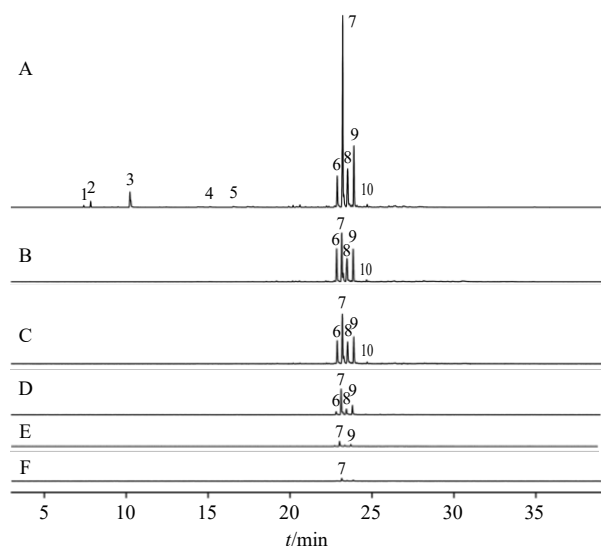
图 2 高良姜油经皮外用后角质层内不同时间驻留成分的GC-MS总离子流图

Fig. 2 GC-MS total ion chromatogram of AOR oil components in stratum corneum at different time points after transdermal topical application

### 3.4 热性中药挥发油在体透皮促渗能力评价

皮肤屏障功能的强弱可以通过 TEWL 值来评价，TEWL 值增大表明皮肤屏障功能下降，而促渗剂应用后 TEWL 值能否恢复到初始值也反映了其作用是否可逆。目前 TEWL 技术常用于评价促渗剂透皮促渗能力<sup>[9-11]</sup>。热性中药挥发油和氮酮在体给药后，大鼠皮肤 TEWL 变化指数见表 5。

由表 5 可见，与对照组相比，氮酮及 5 种热性中药挥发油经皮外用后均能显著提升 TEWL，表明具有透皮促渗能力。方差分析表明，5、10、30、60、120 min 时间点 5 种热性中药挥发油之间均存在显著差异 ( $P < 0.05$ )，说明不同挥发油的透皮促渗能力之间存在差异，透皮促渗能力较强的是高良姜油和干姜油。由于经皮外用 24 h 后的  $\Delta TEWL$  计算皮肤屏障功能的恢复率  $R_{TEWL}$ ，结果氮酮的  $R_{TEWL}$  为 -78.24%，表明氮酮对皮肤屏障功能产生了不可逆的破坏，而相同剂量下的热性中药挥发油的  $R_{TEWL}$  在 80%~100%，并且不同挥发油之间不存在显著差异，表明挥发油对于皮肤屏障功能的改变具有良好



A-干姜油原油 B~F-除去挥发油后 5、10、30、60、120 min 的角质层 1-苾烯 2- $\alpha$ -蒎烯 3-合成右旋龙脑 4-香叶醛 5- $\beta$ -柠檬醛 6-姜黄烯 7-姜油烯 8-法呢烯 9-倍半水芹烯 10- $\alpha$ -佛手柑油烯  
A-ZR oil B~F-stratum corneum of 5, 10, 30, 60, 120 min after removing EOs 1-camphene 2- $\alpha$ -pinene 3-L(-)-borneol 4-citral 5- $\beta$ -cyclocitral 6-curcumene 7-zingiberene 8-farnesene 9-sesquiphellandrene 10- $\alpha$ -bergamotene

图3 干姜油经皮外用后角质层内不同时间滞留成分的GC-MS总离子流图

Fig. 3 GC-MS total ion chromatogram of ZR oil components in stratum corneum at different time points after transdermal topical application

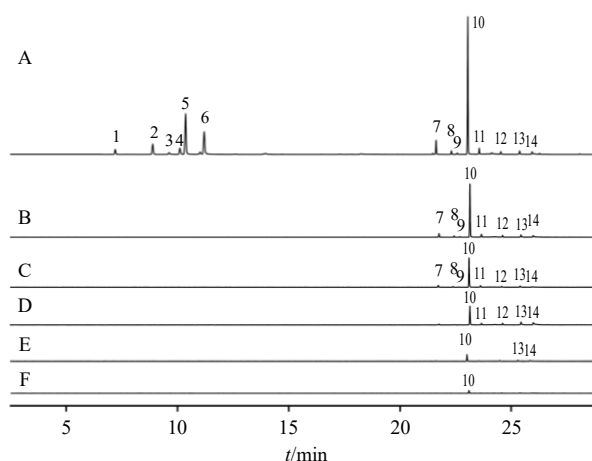
的可逆性。

### 3.5 热性中药挥发油经皮外用后在体红斑分析

热性中药挥发油和氮酮经皮给药后对大鼠皮肤红斑的影响见图7，氮酮对皮肤色度（红斑）的增强比呈现逐渐升高的趋势，且在所有时间点均与对照组有显著性差异 ( $P < 0.05$ )，与此前TEWL不可逆结果相符，提示该剂量下存在显著的皮肤刺激性。而5种热性中药挥发油对皮肤色度（红斑）的增强比均趋于1，与对照组无显著性差异 ( $P > 0.05$ )，说明热性中药挥发油的皮肤刺激性显著低于氮酮，即热性中药挥发油促渗剂的皮肤局部安全性较高。

### 3.6 相关性分析

不同时间点热性中药挥发油 $\Delta$ TEWL和PAR相关性分析结果见表6。Pearson相关性分析结果显示，在5、10、30时热性中药挥发油的 $\Delta$ TEWL与PAR高度正相关（相关系数 $r > 0.92$ ， $P < 0.05$ ），说明在角质层内贮留的倍半萜含量与热性中药挥发油打开大鼠皮肤屏障的作用具有显著相关性。随着时间延长，皮肤角质层内滞留倍半萜含量减少，倍半萜角质层贮库效应减弱，使得大鼠皮肤屏障功能逐渐恢

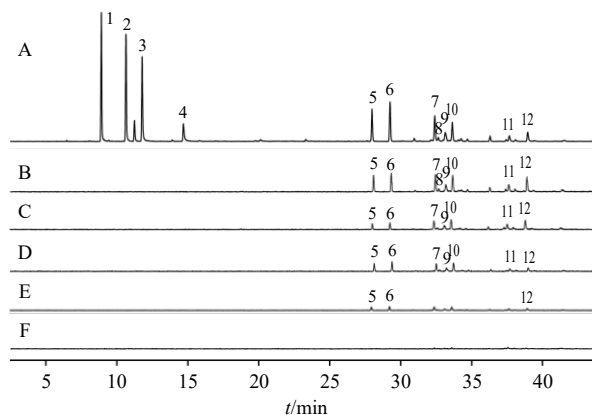


A-胡椒油原油 B~F-除去挥发油后 5、10、30、60、120 min 的角质层 1- $\beta$ -蒎烯 2-桉烯 3-月桂烯 4-水芹烯 5-薷烯 6-柠檬烯 7- $\gamma$ -榄香烯 8-古巴烯 9-白菖烯 10- $\beta$ -石竹烯 11-葎草烯 12- $\delta$ -杜松烯 13-氧化石竹烯 14-桉油烯醇

A-PF oil B~F-stratum corneum of 5, 10, 30, 60, 120 min after removing EOs 1- $\beta$ -pinene 2-sabinene 3-myrcene 4-carene 5-*o*-cymene 6-limonene 7- $\gamma$ -elemene 8-copaene 9-calarene 10- $\beta$ -caryophyllene 11-humulene 12- $\delta$ -cadinene 13-caryophyllene oxide 14-spathulenol

图4 胡椒油经皮外用后角质层内不同时间滞留成分的GC-MS总离子流图

Fig. 4 GC-MS total ion chromatogram of PF oil components in stratum corneum at different time points after transdermal topical application

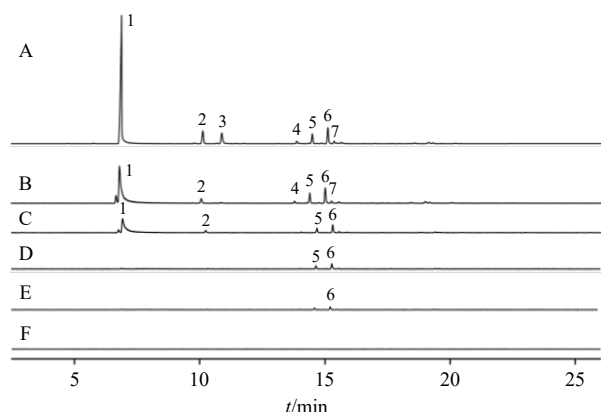


A-吴茱萸油原油 B~F-除去挥发油后 5、10、30、60、120 min 的角质层 1-桉烯 2-柠檬烯 3- $\beta$ -蒎烯 4-芳樟醇 5- $\beta$ -榄香烯 6- $\beta$ -石竹烯 7-古巴烯 8- $\beta$ -瑟林烯 9- $\alpha$ -瑟林烯 10- $\gamma$ -古芸烯 11-桉油烯醇 12-氧化石竹烯

A-EF oil B~F-stratum corneum of 5, 10, 30, 60, 120 min after removing EOs 1-sabinene 2-limonene 3- $\beta$ -pinene 4-linalool 5- $\beta$ -elemene 6- $\beta$ -caryophyllene 7-copaene 8- $\beta$ -selinene 9- $\alpha$ -selinene 10- $\gamma$ -gurjunene 11-spathulenol 12-caryophyllene oxide

图5 吴茱萸油经皮外用后角质层内不同时间滞留成分的GC-MS总离子流图

Fig. 5 GC-MS total ion chromatogram of EF oil components in stratum corneum at different time points after transdermal topical application



A-肉桂油原油 B~F-除去挥发油后 5、10、30、60、120 min 的角质层 1-桂皮醛 2-古巴烯 3-顺-2-甲氧基肉桂酸 4-γ-木乌龙烯 5-α-木乌龙烯 6-δ-杜松烯 7-萜澄茄油宁烯

A-CC oil B~F-stratum corneum of 5, 10, 30, 60, 120 min after removing EOs 1-cinnamaldehyde 2-copaene 3-2-methoxycinnamic acid 4-γ-muurolene 5-α-muurolene 6-δ-cadinene 7-cubebene

图6 肉桂油经皮外用后角质层内不同时间驻留成分的GC-MS总离子流图

Fig. 6 GC-MS total ion chromatogram of CC oil components in stratum corneum at different time points after transdermal topical application

表4 热性中药挥发油经皮外用后不同时间点角质层内倍半萜的峰面积比例 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 4 Peak area ratio of sesquiterpenoids stored in stratum corneum by EOs from TCM with hot property at different time after transdermal topical application ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

挥发油	角质层内倍半萜的峰面积比例 (PAR) /%				
	5 min	10 min	30 min	60 min	120 min
高良姜油	44.54 ± 4.25	29.08 ± 1.81	12.47 ± 1.03	5.61 ± 0.24	1.42 ± 0.50
干姜油	23.23 ± 0.64	16.83 ± 2.85	7.55 ± 1.45	2.94 ± 0.43	1.29 ± 0.34
胡椒油	15.34 ± 2.30	8.99 ± 1.32	5.62 ± 2.20	1.95 ± 0.12	0.66 ± 0.25
吴茱萸油	14.55 ± 0.88	7.91 ± 0.34	4.64 ± 0.66	1.50 ± 0.86	-
肉桂油	12.34 ± 1.76	6.01 ± 1.52	3.96 ± 1.29	1.38 ± 0.21	-

表5 热性中药挥发油及氮酮经皮外用后不同时间点的ΔTEWL值 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 5 ΔTEWL Values of EOs from TCM with hot property at different time after transdermal topical application ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

挥发油	ΔTEWL 值/(g·m <sup>-2</sup> ·h <sup>-1</sup> )				
	5 min	10 min	30 min	60 min	120 min
对照	-1.66 ± 1.90	-2.15 ± 3.18	-1.50 ± 2.57	0.09 ± 1.86	-0.09 ± 2.69
高良姜油	21.06 ± 5.05***	20.44 ± 5.47***	19.19 ± 7.90***	17.49 ± 8.85***	14.31 ± 7.76**
干姜油	16.54 ± 5.94***	16.30 ± 4.95***	14.63 ± 4.84***	14.52 ± 3.76***	12.91 ± 4.18***
胡椒油	11.12 ± 4.97***	10.70 ± 4.55***	8.79 ± 4.25***	5.48 ± 3.90*	3.74 ± 4.43
吴茱萸油	7.77 ± 5.93**	7.13 ± 5.27**	6.22 ± 4.49**	5.44 ± 3.08**	5.90 ± 4.56*
肉桂油	10.32 ± 2.60***	10.44 ± 2.20***	9.33 ± 2.04***	8.25 ± 3.14***	7.05 ± 3.44**
氮酮	32.69 ± 8.63***	31.69 ± 9.68***	31.89 ± 12.70***	31.06 ± 14.19***	35.01 ± 15.65***

与对照组比较: \*P<0.05 \*\*P<0.01 \*\*\*P<0.001

\*P<0.05 \*\*P<0.01 \*\*\*P<0.001 vs control group

复,到 60 min 时热性中药挥发油的 ΔTEWL 与 PAR 相关性下降但仍具有显著性,到 120 min 时不再具有显著性。相关性分析结果提示倍半萜角质层贮库效应对大鼠皮肤屏障具有显著影响,是热性中药挥发油透皮促渗的重要机制。

#### 4 讨论

药性理论是中药的核心理论,药性是中药临床应用的主要依据。清代“外治之宗”吴尚先基于大量临床实践在《理渝骈文》中总结出“热者易效,凉者次之,热性急而凉性缓也”的药性规律。本课题组前期对于辛味中药挥发油透皮促渗规律研究也发现存在“热者易效”的规律,即在辛味的前提下,热性中药挥发油高良姜油、干姜油、胡椒油、吴茱萸油、肉桂油相比于温性中药挥发油而言具有更为显著的透皮促渗能力,数据挖掘发现其主要物质基础可能是倍半萜<sup>[5]</sup>。同时这 5 种挥发油也是目前有文献报道能够促渗的热性中药挥发油<sup>[5,12]</sup>,因此,选择作为研究对象。

长期以来,倍半萜类成分因为细胞毒性相对较

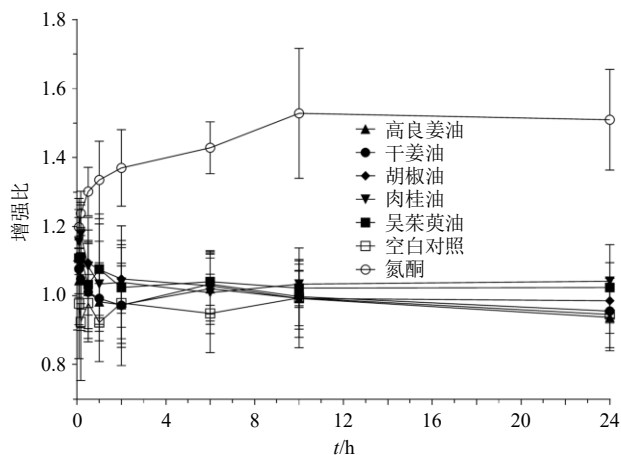


图 7 热性中药挥发油经皮外用后的皮肤红斑变化曲线 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 7 Skin EI versus time curve following treatment with different EOs from TCM with hot property ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

表 6 热性中药挥发油经皮外用后不同时间点  $\Delta$ TEWL 和 PAR 的相关系数

Table 6 Correlation coefficients between  $\Delta$ TEWL and PAR of EOs from TCM with hot property at different time after transdermal topical application

t/min	r	t/min	r
5	0.927 0**	60	0.886 0**
10	0.939 0**	120	0.792 0
30	0.934 0**		

\*\*P<0.01

大<sup>[13]</sup>而较少作为促渗剂，一般认为单萜类成分是中药挥发油透皮促渗的主要物质基础。但是经皮外用后的研究发现，由于单萜分子量相对较小且脂溶性适中，能够迅速透皮吸收入血而难以在角质层内驻留，如高良姜油中主要单萜类成分 1,8-桉叶素透皮吸收后相对于口服的生物利用度高达 85.49%<sup>[6]</sup>。与单萜相比，倍半萜碳链更长、脂溶性更高，经皮外用后更容易驻留在亲脂性的、由死细胞组成的角质层中，一方面能够长时间地发挥透皮促渗作用，另一方面减少了与皮肤角质层下的活细胞的接触而提高了安全性（倍半萜的皮肤细胞毒性显著高于单萜），因此虽然热性中药挥发油的皮肤细胞毒性显著高于温性中药挥发油，但是两者之间的在体皮肤刺激性却没有显著差别<sup>[7]</sup>。

研究表明，与温性和凉性中药挥发油不同，热性中药挥发油均含有一定比例的倍半萜类成分，可能是其药性的重要物质基础。本研究表明，角质层中倍半萜驻留能力与热性中药挥发油打开皮肤屏障

提高 TEWL 的能力显著相关，证明倍半萜角质层贮库效应是热性中药挥发油透皮促渗的主要机制。也就是说，角质层是公认的最主要的皮肤屏障，促渗剂如果不能有效驻留在角质层，其透皮促渗能力将大打折扣，因此促渗剂的角质层动力学行为近年来逐渐得到重视<sup>[14]</sup>。

近年来，基于温度敏感的瞬时感受器电位离子通道（transient receptor potential ion channels, TRP）诠释中药寒热温凉“四气”药性科学内涵越来越得到重视<sup>[15]</sup>。在经皮外用途下，石竹烯、氧化石竹烯等具有较好角质层驻留效果的倍半萜已被发现是皮肤“冷通道”TRPM8 的阻断剂<sup>[16]</sup>，并且 TRPM8 通道也会影响到皮肤屏障功能<sup>[17]</sup>，因此基于 TRP 通道进一步阐明中药挥发油热性与透皮促渗能力联系的科学机制值得研究。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 陈军, 刘培, 蒋秋冬, 等. 中药挥发油作为透皮吸收促进剂的现状与展望 [J]. 中草药, 2014, 45(24): 3651-3655.
- [2] Herman A, Herman A P. Essential oils and their constituents as skin penetration enhancer for transdermal drug delivery: A review [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2015, 67(4): 473-485.
- [3] Schafer N, Balwierz R, Biernat P, et al. Natural ingredients of transdermal drug delivery systems as permeation enhancers of active substances through the stratum corneum [J]. *Mol Pharm*, 2023, 20(7): 3278-3297.
- [4] 陈军, 刘培, 蒋秋冬, 等. 基于药性特征的中药挥发油透皮促渗作用规律性认识的思路与方法 [J]. 中草药, 2016, 47(24): 4305-4312.
- [5] 杨文国, 朱学敏, 吴凤焯, 等. 基于逐步判别法分析辛味中药挥发油“四气”药性、透皮促渗能力和化学成分的相关因素 [J]. 中草药, 2019, 50(17): 4219-4224.
- [6] Dong J, Zhu X M, Wu F Y, et al. Development of galangal essential oil-based microemulsion gel for transdermal delivery of flurbiprofen: Simultaneous permeability evaluation of flurbiprofen and 1,8-cineole [J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2020, 46(1): 91-100.
- [7] 顾琦, 朱学敏, 魏旭超, 等. 温热药性对中药挥发油透皮促渗剂皮肤毒性的影响及其机制研究 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46(2): 359-365.
- [8] Liu X C, Quan P, Li S S, et al. Time dependence of the enhancement effect of chemical enhancers: Molecular mechanisms of enhancing kinetics [J]. *J Control Release*, 2017, 248: 33-44.



- [9] Xie F, Chai J K, Hu Q, *et al.* Transdermal permeation of drugs with differing lipophilicity: Effect of penetration enhancer camphor [J]. *Int J Pharm*, 2016, 507(1/2): 90-101.
- [10] Liu X C, Liu M Y, Liu C, *et al.* An insight into the molecular mechanism of the temporary enhancement effect of isopulegol decanoate on the skin [J]. *Int J Pharm*, 2017, 529(1/2): 161-167.
- [11] Elmahjoubi E, Frum Y, Eccleston G M, *et al.* Transepidermal water loss for probing full-thickness skin barrier function: Correlation with tritiated water flux, sensitivity to punctures and diverse surfactant exposures [J]. *Toxicol Vitro*, 2009, 23(7): 1429-1435.
- [12] 杨文国, 陈军, 刘培, 等. 基于数据挖掘方法研究挥发油透皮促渗作用与中药药性间的关联性 [J]. *中国中药杂志*, 2015, 40(23): 4609-4615.
- [13] Mendanha S A, Moura S S, Anjos J L V, *et al.* Toxicity of terpenes on fibroblast cells compared to their hemolytic potential and increase in erythrocyte membrane fluidity [J]. *Toxicol Vitro*, 2013, 27(1): 323-329.
- [14] Ruan J H, Liu C, Wang J Q, *et al.* Efficacy and safety of permeation enhancers: A kinetic evaluation approach and molecular mechanism study in the skin [J]. *Int J Pharm*, 2022, 626: 122155.
- [15] 唐宗湘. 温度敏感的 TRP 通道与中药药性四气理论 [J]. *南京中医药大学学报*, 2015, 31(4): 301-304.
- [16] Zhou W L, Yang S L, Li B W, *et al.* Why wild giant pandas frequently roll in horse manure [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, 117(51): 32493-32498.
- [17] Joshi A, Joshi A, Patel H, *et al.* Cutaneous penetration-enhancing effect of menthol: calcium involvement [J]. *J Pharm Sci*, 2017, 106(7): 1923-1932.

[责任编辑 郑礼胜]