

不同双黄膏剂体外扩散的实验研究

王 敏 许永崧 龚慕辛 贾富霞 任 维 赵香妍

(首都医科大学中医药学院,北京,100069)

摘要 目的:研究3种双黄膏剂中黄芩苷在蛇蜕、小鼠腹皮的经皮扩散情况并对结果进行分析比较。方法:使用智能透皮试验仪对双黄冰凝胶(A)、双黄冰乳膏(B)、双黄乳膏(C)3种膏剂进行体外经皮扩散实验,测定黄芩苷的累积透过量和经皮扩散速率。结果:小鼠腹皮的累积透过量及经皮扩散速率均明显高于蛇蜕($P < 0.01$)。对于蛇蜕,各时间点A的累积透过量及经皮扩散率高于B、C($P < 0.01$),而B与C相比差异无统计学意义;对于小鼠腹皮,3种软膏累积透过量和经皮扩散率均无统计学意义。结论:采用不同皮肤会造成实验结果的不同。对于可增加角质层水合作用的凝胶剂,蛇蜕灵敏度高,干扰因素少,结果稳定。

关键词 黄芩苷;双黄膏;凝胶;蛇蜕;小鼠腹皮;经皮扩散;冰片

Experimental Studies of Different Shanghuang Ointment on Transdermal Diffusion in Vitro

Wang Min, Xu Yongsong, Gong Muxin, Jia Fuxia, Ren Wei, Zhao Xiangyan

(School of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100069, China)

Abstract Objective: To study the transdermal diffusion of baicalin in three Shanghuang Ointment and compare the effect of different skin and ointment bases on diffusion. **Methods:** Intelligent transdermal test instrument was used to determine the cumulative permeating amounts of baicalin from Shanghuang Carbomer gel (A), Shanghuang Cream with borneol (B) and without borneol (C). Then diffusion rate could be calculated. **Results:** the cumulative permeating amounts and transdermal diffusion rate on mice abdomen skin were significantly higher than those on snake slough ($P < 0.01$). On snake slough, the cumulative permeating amounts and transdermal diffusion rate of baicalin in cream A was significantly higher than cream B and C ($P < 0.01, 0.01$). The difference of the cumulative permeating amounts between two creams was not significant on mice skin. **Conclusion:** Different skin will make the different outcome. Shanghuang Carbomer gel can soften cuticles, and snake slough is superior to mice skin because of its high sensitivity, less interferences and excellent stability.

Key Words Baicalin; Carbomer gel; Shanghuang ointment; Snake slough; Mice abdomen skin; Percutaneous diffusion; Borneol

中图分类号:R285.5;R289.6 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2015.05.033

双黄膏剂是含有黄芩、大黄等药的外用乳膏,具有清热解毒、消炎止痛作用,主要用于治疗带状疱疹^[1]。本实验就其基质类型,以及透皮吸收促进剂-冰片对有效成分黄芩苷体外经皮渗透的影响进行考察,为进一步筛选处方做准备。本实验利用蛇蜕、小鼠腹皮研究体外经皮扩散的情况。

1 材料与方法

1.1 一般材料 黄芩、大黄等饮片60%醇提物(自制),机制冰片(合成龙脑,株洲松本林化有限公司,批号20130126),氯化钠(北京现代东方精细化学品有限公司,批号20130312),卡波姆(南京燕化化工, HY-Ⅲ940型,批号20070411),尼泊金乙酯(北京化学试剂公司,批号011115),三乙醇胺(北京现代

东方精细化学品有限公司,批号20120612);硬脂酸(北京益利精细化学品有限公司,批号20000717),单硬脂酸甘油酯(国药集团化学试剂有限公司,批号:20130204)、蓖麻油(国药集团化学试剂有限公司,批号20120321),丙三醇(北京现代东方精细化学品有限公司,批号20101220),蒸馏水。乌梢蛇蛇蜕(整条,2013年购于安国药市);雄性ICR小鼠(北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证编号:SCXK(京)2012-0001)。

智能透皮试验仪(YB-P6,天津市富兰斯电子科贸有限公司),超声波清洗机(KQ100-VDE型,昆山市超声仪器有限公司),紫外分光光度计(UV-1800PC,上海美普达仪器有限公司),十万分之一电

子天平 (MS105, METTLER TOLEDO), 电子天平 (TE1502S, Sartorius), 电动脱毛器, 手术刀片。

1.2 双黄膏剂的制备 A(双黄冰凝胶)取甘油 10 g 置乳钵中,加卡波姆 1.5 g 充分研磨使润湿,加少量蒸馏水充分研匀后移至烧杯中。另取三乙醇胺 1.5 g、尼泊金乙酯 0.2 g、蒸馏水适量使溶解,加入烧杯中,边加边搅拌使成凝胶状,将余量蒸馏水加入,充分搅拌均匀得 90 g 空白凝胶剂待用。取冰片 1 g 研碎,与空白凝胶剂 5.55 g 混匀。将浓缩好的提取物 3.45 g 置于研钵中,加入上述凝胶研匀,制得 50 g^[1]。

B(双黄冰乳膏)及 C(双黄乳膏剂)取硬脂酸 18 g、单硬脂酸甘油酯 6 g、蓖麻油 30 g 置烧杯内,水浴加热至 70 ~ 80 ℃,作为油相;另取三乙醇胺 2.2 mL、尼泊金乙酯 0.075 g、甘油 15 g、蒸馏水 75 mL 加热至 70 ~ 80 ℃,作为水相,将水相缓缓倒入油相中,边加边搅拌,至乳化完全,放冷即得乳膏空白基质。取浓缩好的提取物 3.45 g 于研钵中,加入冰片 1 g 后与空白基质 45.55 g 混合,研匀,制得 50 g 的 B。取浓缩好的提取物 3.45 g 于研钵中,与空白基质 46.55 g 混合,研匀,制得 50 g 的 C。

1.3 标准曲线的制备 精密称取黄芩苷对照品 1.3 mg,置于 10 mL 量瓶中,加甲醇溶液并稀释至刻度,摇匀得到 0.13 mg/mL 对照品储备液,逐级稀释,于 278 nm 测定吸光度,以浓度对吸收光度作图绘制标准曲线。得到标准曲线 $y = 79.5359x - 0.0019$, $r = 0.9997$,在 0.0266 ~ 10.6 μg/mL 浓度范围内线性良好。

1.4 渗透试验用皮肤的处理 1)蛇蜕的处理:取蛇蜕背部,强光下观察,选取无破损的蛇蜕,剪成适当大小,用 0.9% 氯化钠洗净并浸泡 30 min 后,用滤纸吸干表面水分,备用。2)小鼠腹皮的处理:取健康雄性 ICR 小鼠(30 ± 2)g,断脊髓处死,立即剪取腹部皮肤,先用手术剪剪去长毛,然后再用自动脱毛器剃净剩余的短毛。仔细剥离皮下脂肪层和结缔组织,

用 0.9% 氯化钠冲洗干净,置 0.9% 氯化钠中, - 20 ℃ 中保存备用,实验前自然解冻,并用滤纸吸干后使用。

1.5 经皮扩散操作方法 采用改良扩散池,暴露皮肤面积为 1.69 cm²,接收池容积为 16.4 mL。接收池内放入转子,将剪好的完整蛇蜕(有棱状突起一面向上)、小鼠腹皮(角质层向上)固定在智能透皮试验仪的扩散池与接收池之间,用夹子固定好,真皮一侧与接收液紧密接触。将双黄膏剂 1.0 g 均匀、严密涂于暴露的蛇蜕、小鼠腹皮表面。设定智能透皮试验仪的条件:温度 37 ℃,水浴保持恒温,转速 500 r/min。分别在放入后的 0.5 h、1 h、2 h、4 h、6 h、8 h、10 h、12 h,从接收池精密取 2.0 mL 释放液,并立即补充等量恒温的 0.9% 氯化钠。

1.6 含量测定方法 以 0.9% 氯化钠作空白对照,释放液立即在 278 nm 处测定吸光度,记录实验数据。浓度较大超出紫外量程或线性范围的,进行稀释后测定。每个样品测定 3 次,每组平行操作 6 次。以样品液吸光度代入回归方程求出样品中黄芩苷的含量,得到累积透过量。 $Q_n = C_n \times V + V_r \times \sum_{i=1}^{n-1} C_i$ 。其中, C_n 表示第 n 个时间点的接收液药物浓度(mg/mL), V 表示接收池内 0.9% 氯化钠体积(需考虑实验过程中存在蒸发, V 动态变化), V_r 表示取样体积($V = 2$ mL), C_i 为第 i 个时间点的接收液药物浓度(μg/mL), $i = n - 1$ 。计算出累积透皮吸收量 Q (mg)。

2 结果

1)双黄膏剂 A、B、C 经蛇蜕和小鼠腹皮透皮释放不同时间累积透过量见表 1。

2)双黄膏剂 A、B、C 经蛇蜕和小鼠腹皮不同时间的累积透过量经线性回归,直线的斜率即经皮扩散速率(μg/h),回归方程及相关系数 R^2 见表 2。

3)由表 1 可以看出,12 h 黄芩苷累积透过量:A 膏小鼠腹皮是蛇蜕的 7 倍;B 膏小鼠腹皮是蛇蜕的 107 倍;C 膏小鼠腹皮是蛇蜕的 73 倍。12 h 累积透

表 1 不同双黄膏剂中黄芩苷累积透过量($Q \pm SD, \mu g, n = 6$)

皮肤	膏剂	扩散时间							
		0.5 h	1 h	2 h	4 h	6 h	8 h	10 h	12 h
蛇蜕	A	3.87 ± 1.11	5.93 ± 1.78	11.7 ± 4.06	19.7 ± 9.99	26.2 ± 13.1	34.1 ± 11.3	42.2 ± 10.5	54.7 ± 13.4
	B	1.65 ± 0.601	1.78 ± 0.465	2.48 ± 0.545	3.13 ± 0.272	3.78 ± 0.497	4.56 ± 0.260	4.92 ± 0.438	5.96 ± 0.914 **
	C	2.03 ± 0.775	2.77 ± 1.69	3.23 ± 2.26	3.61 ± 1.61	4.25 ± 1.62	4.64 ± 2.00	5.23 ± 2.64	7.02 ± 2.74 **
小鼠腹皮	A	23.1 ± 9.99	41.9 ± 21.7	87.3 ± 29.0	148 ± 42.5	215 ± 47.6	263 ± 78.3	306 ± 75.7	382 ± 82.0 ^{△△}
	B	46.1 ± 38.8	80.3 ± 60.5	139 ± 90.6	252 ± 144	336 ± 188	435 ± 219	510 ± 242	640 ± 292 ^{△△}
	C	29.6 ± 9.26	56.4 ± 24.3	102 ± 51.2	177 ± 103	275 ± 95.7	356 ± 120	493 ± 280	513 ± 180 ^{△△}

注:A:双黄冰凝胶,B:双黄冰乳膏,C:双黄乳膏。同类皮肤 B、C 与 A 相比,** $P < 0.01$;同种软膏小鼠腹皮与蛇蜕相比,^{△△} $P < 0.01$ 。

过量均值在蛇蜕为 $A > C \approx B$, A 与 C 之间差异有统计学意义(各时间点 $P \leq 0.01$), B 与 C 之间差异无统计学意义(各时间点 $P \geq 0.216$); 12 h 累积透过量均值在小鼠腹皮虽为 $B > C > A$, 但 B 与 A 差异无统计学意义(各时间点 $P \geq 0.084$), B 与 C 差异同样无统计学意义(各时间点 $P \geq 0.136$)。经皮扩散速率结果与之类似。

表 2 不同双黄膏剂中黄芩苷经皮扩散速率(μg/h,n=6)				
皮肤	膏剂	回归方程	R ²	扩散速率
蛇蜕	A	$y = 4.19x + 2.00$	0.993	4.19 ± 1.05
	B	$y = 0.360x + 1.58$	0.990	$0.360 \pm 0.0736^{**}$
	C	$y = 0.354x + 2.17$	0.941	$0.354 \pm 0.119^{**}$
小鼠腹皮	A	$y = 30.2x + 19.1$	0.993	$30.2 \pm 6.26^{\Delta\Delta}$
	B	$y = 49.8x + 34.4$	0.996	$49.8 \pm 21.5^{\Delta\Delta}$
	C	$y = 44.2x + 10.2$	0.989	$44.2 \pm 17.9^{\Delta\Delta}$

注:A:双黄冰凝胶,B:双黄冰乳膏,C:双黄乳膏。同类皮肤 B 、 C 与 A 相比, $**P < 0.01$; 同种软膏小鼠腹皮与蛇蜕相比, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

3 讨论

冰片为常用中药之一,具有通诸窍,散郁火,去翳明目,消肿止痛之功能,对药物具有促透作用^[2-6]。有文献^[7]指出冰片的促进作用主要在角质层,3%冰片促透作用最显著,稍弱于氮酮。在对人参皂苷 Rg1 小鼠体外促透皮效果比较中,冰片弱于氮酮和丙二醇^[8]。也有文献^[9]指出冰片对黄芩苷透过离体角膜具有显著的促进作用,0.1%冰片渗透效果最佳。但从本实验结果上看,黄芩苷透过蛇蜕扩散时,乳膏加冰片组(即 B , 含冰片 2%)与不加冰片组(即 C)相比,累积透过量均值 C 甚至大于 B , 但差异不具统计学意义。黄芩苷透过小鼠腹皮扩散时,尽管累积透过量均值 B 大于 C , 但由于小鼠腹皮扩散数据标准差较大^[10], 差异无统计学意义。此结果与上述研究不符,推测原因可能是冰片用量不合适,或者试验过程中冰片挥发损失。曾有文献报道^[11]人体皮肤表面温度约为 32℃,在透皮吸收实验中接收液温度应与皮肤表面温度一致,本实验中温度设定为 37℃,是否过高导致试验过程中冰片挥发,以致促透效果不明显,有待进一步研究。有研究者采用 Caco-2 细胞模型,研究不同吸收促进剂对绿原酸跨膜转运的影响,发现冰片对其通过 Caco-2 细胞膜的转运过程无影响,而卡波姆则有促吸收作用^[12],其所用冰片与本实验来源相同,为合成冰片,其与天然冰片^[13-15]品质上的差异是否也是促透作用不明显的原因有待进一步验证。

在外用膏剂基质对药物透皮吸收的影响方面,一般认为促透作用是乳剂型基质 > 水溶性基质,主

要由于前者含有的乳化剂具有促进吸收的作用,这种趋势在我们采用小鼠腹皮进行试验时也观察到,与前人的研究结果类似^[16]。然而,在采用蛇蜕进行试验时发现结果相反,凝胶剂中黄芩苷累积透过量和经皮扩散速率均大于乳剂型基质。分析原因,可能与凝胶剂极大增强了蛇蜕角质层的水化有关。凝胶剂较乳膏剂更易于涂抹,其涂抹后可紧密粘附在皮肤表面形成一层膜,产生包封作用,有效防止水分散失,增加水合作用,角质层含水量高有利于药物经皮扩散^[17],从而增加药物透过。本凝胶剂选用卡波姆作为基质,它具有较强的吸湿性,也有利于药物释放^[18]。作为促进剂,卡波姆通过与 Ca^{2+} 螯合并减少细胞外 Ca^{2+} 浓度,使依赖细胞外 Ca^{2+} 浓度的紧密连接打开,增加旁细胞转运。同时卡波姆的抑酶效应和生物黏附性也可促使药物肠吸收增加^[12]。而在小鼠腹皮上,除了角质层外还有真皮存在,药物经皮扩散的过程远比单纯模拟人皮肤角质层的蛇蜕复杂,乳化剂对于水溶性、脂溶性均不佳的黄芩苷扩散表现出了促进作用。本试验结果也说明,透皮吸收研究中实验皮肤的选择对预测药物的透皮特性有重要意义,透皮吸收试验选取皮肤不同,会影响试验的结论。在进行透皮试验时,应根据试验目的选择适宜的皮肤^[19],蛇蜕更适于观察药物处方组成对角质层的影响。

参考文献

[1] 夏德洪. 双黄冰凝胶剂的制备[J]. 中国医院药学杂志, 1999, 19(12): 755.

[2] 陆崑, 乔立业, 苗梦梦, 等. 透皮促进剂对肤康祛斑凝胶体外透皮吸收的影响[J]. 中南药学, 2014, 12(2): 131-134.

[3] 周小虎. 龙脑对药物经皮渗透作用的影响[J]. 河南中医, 2014, 34(1): 156-157.

[4] 卢映, 涂星, 吴俊红, 等. 不同基质和促渗剂对川芎嗪凝胶经皮吸收的影响[J]. 中国新药与临床药理, 2013, 24(2): 166-169.

[5] 范彬, 石晓峰, 李爽. 不同透皮促进剂对祖师麻体外透皮吸收的影响[J]. 中成药, 2014, 36(3): 631-634.

[6] 吴国民, 邓金梅, 陈树强, 等. 黄芩素水膏释放度的改进[J]. 临床合理用药, 2013, 6(3): 87-88.

[7] 许碧莲, 王晖, 许卫铭, 等. 冰片对盐酸川芎嗪促透作用的研究[J]. 中成药, 2001, 23(12): 864-867.

[8] 韩莉, 王平, 刘善新, 等. 不同促透剂对人参皂苷 Rg1 体外透皮吸收的影响[J]. 药学研究, 2014, 33(7): 391-394.

[9] 欧阳丽影, 毕开顺, 张肖宁, 等. 冰片对黄芩苷角膜透过性的影响[J]. 沈阳药科大学学报, 2013, 30(5): 388-391, 398.

[10] 邹渭洪, 付成效, 毕津莲, 等. 氮酮、丙二醇对湿疹喷雾剂中黄芩苷透皮吸收的影响[J]. 中国现代医学杂志, 2013, 22(22): 32-34.

号 13 为基准,其他样品与其相对比值的比值差值的绝对值之和,即非关联系数;非关联系数与有效指标性成分的数目的比值,即非关联度,进而得到关联度,以反映饮片质量之间的关联性,得表 5。

由表 5 可知,关联度由高到低排序为批号 13 (0/100%) > 批号 14 (0.29/92.84%) > 批号 4 (0.61/84.76%) > 批号 15 (0.72/82.07%) > 批号 6 (0.73/81.80%) > 批号 8 (0.78/80.38%) > 批号 5 (1.02/74.38%) > 批号 12 (1.44/63.97%) > 批号 2 (1.58/60.60%) > 批号 7 (1.79/55.36%) > 批号 3 (1.88/53.04%) > 批号 1 (2.26/43.54%) > 批号 10 (2.39/40.32%) > 批号 11 (3.44/14.11%) > 批号 9 (3.58/10.51%), 可得批号 14、4、15、6、8 与批号 13 关联性较高,而批号 11、9 相差甚远。

3 讨论

本文基于药物体系质量评价模式,对生地黄进行质量表征及关联分析研究,确定出批号 2、8、14、5、4 有效指标性成分和总环烯醚萜、总酚含量总体高于基准批号 13,批号 14、5 关键有效指标性成分和总环烯醚萜、总酚含量与基准批号 13 接近。其中批号 14、4、15、6、8 与基准批号 13 关联性最高,综合评价得出批号 14、5、4、8 质量优良度居前,其次为批号 2、15、6。

中药饮片质量与其所含有效化学成分类型及存在的量、组成比例等有关。本文在自然药理学观相关理论的指导下,基于药物体系组成成分的发现,运用有关中药质量评价模式,对 15 个生地黄饮片样品质量进行表征,并以具有确切药效的批号 13 为基准,进行质量关联度分析比较,综合精准评价出生地黄饮片质量的优良度。即综合考量了生地黄应用有效

性及质量关联性,从而为生地黄资源筛选及其药物的原料质量控制及应用提供了依据,亦为中药药材及其饮片的质量评价提供了研究借鉴。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中国药典[M]. 一部. 北京:中国医药科技出版社,2010:115-117.
- [2] 石任兵,王永炎,姜艳艳,等. 论中药化学发展近况[J]. 北京中医药大学学报,2012,35(3):153-159.
- [3] 石任兵,王永炎. 自然药理学观的相关性思考[J]. 北京中医药大学学报,2012,35(4):221-225.
- [4] 李更生,于震,王慧森. 地黄化学成分与药理研究进展[J]. 国外医学中医中药分册,2004,26(2):74-78.
- [5] 安琪. 基于药物体系的紫苏方药物制备工艺与质量表征关联分析研究[D]. 北京:首都医科大学,2014.
- [6] 安琪,唐雪阳,卢广英,等. 紫苏方药物制备物的质量表征及其关联分析[J]. 北京中医药大学学报,2014,37(6):414-419.
- [7] 刘斌. 苦参汤化学成分研究[D]. 北京:北京中医药大学,2005.
- [8] 梅莹莹,许舒娅,左胜,等. 基于药物体系的连翘饮药物制备物质量表征分析研究[J]. 北京中医药大学学报,2014,37(5):337-343.
- [9] 左胜,孙雅姝,迟蕾,等. 基于药物体系的藁本质量评价研究[J]. 北京中医药大学学报,2014,37(7):481-485.
- [10] 梅莹莹. 基于药物体系的连翘饮药物制备工艺与质量表征关联分析研究[D]. 北京:北京中医药大学,2014.
- [11] 迟蕾,孙雅姝,杨书娟,等. 芍药方药物制备物的质量表征及其关联分析[J]. 北京中医药大学学报,2015,38(3):195-200.
- [12] 温静,唐雪阳,李焕娟,等. 基于药物体系质量评价模式的丹参质量表征关联分析研究[J]. 中华中医药学刊,2015,33(4):843-846.
- [13] 李焕娟,张璐,彭平,等. 基于药物体系质量评价模式的远志质量表征关联分析研究[J]. 北京中医药大学学报,2014,37(12):834-840.

(2014-12-24 收稿 责任编辑:张文婷)

(上接第 764 页)

- [11] 张文强. 低分子量脂质体透明质酸脂质体的制备及体外经皮渗透研究[D]. 广州:华南理工大学,2009.
- [12] 任静,邓盛齐,蒋学华,等. 吸收促进剂对绿原酸的跨膜转运影响[J]. 药科学报,2014,49(2):252-255.
- [13] 王丽峰,张思培,王阳. 不同促渗剂对秦皮甲素乳膏透皮吸收的影响[J]. 天津医科大学学报,2014,20(4):320-322.
- [14] 徐定平. 不同促渗剂对苗药秤钩风的透皮吸收特性研究[J]. 华西医学,2014,29(7):1316-1318.
- [15] 陆洋,杜守颖,姚宗玲,等. 天然冰片、合成冰片对栀子提取物黏膜促渗作用研究[J]. 中国中药杂志,2009,34(10):2017-

2020.

- [16] 姜纪武,刘嘉,王晴,等. 基质与促进剂对黄芩苷软膏经皮渗透的影响[J]. 中华实用医药杂志,2008,8(2):34-37.
- [17] 管咏梅,丁莹,张霄潇,等. 雷公藤凝胶与软膏中雷公藤内酯的经皮透过性比较研究[J]. 中国药师,2008,11(4):373-375.
- [18] 渠莉,胡茗,李景云. 复方黄芩凝胶剂的研制及临床观察[J]. 天津医科大学学报,2005,11(4):614-617.
- [19] 王敏,赵婷,龚慕辛,等. 双黄乳膏不同皮肤体外扩散的实验研究[J]. 世界中医药,2013,8(10):1219-1221.

(2014-04-26 收稿 责任编辑:徐颖)