

实验研究

双黄乳膏不同皮肤体外扩散的实验研究

王 敏 赵 婷 龚慕辛 尚雅文 张 超

(首都医科大学,北京,100069)

摘要 目的:研究两种氮酮(Azone)含量的双黄乳膏中盐酸小檗碱在不同皮肤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含氮酮 1%(A)和 4%(B)的两种双黄乳膏进行体外经皮扩散实验,测定累积透过量及经皮扩散速率。结果:鼠皮(背皮、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,A 乳膏累积透过量及经皮扩散率高于含 B 乳膏($P = 0.037, 0.028$);对于鼠皮,则累积透过量差异无统计学意义,经皮扩散率 B 乳膏反而高于 A 乳膏($P = 0.046$)。结论:采用不同皮肤会造成实验结果的不同。用蛇蜕筛选氮酮的用量,灵敏度高,干扰因素少,结果稳定。

关键词 双黄乳膏;蛇蜕;鼠腹皮;鼠背皮;经皮扩散;氮酮

Experimental Study on Transdermal Diffusion of Shanghuan Cream in Vitro on Different Skins

Wang Min, Zhao Ting, Gong Muxin, Shang Yawen, Zhang Chao

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

Abstract Objective: To study the transdermal diffusion of berberine hydrochloride in Shanghuang Cream with two different Azone contents on different skins and to compare and analyze the effect. **Methods:** Intelligent transdermal test instrument was used to determine the cumulative permeating amounts of berberine hydrochloride in two kinds of Shanghuang Cream with 1% azone (Cream A) and 4% azone (Cream B). Then diffusion rate was calculated. **Results:** The cumulative permeating amounts and transdermal diffusion rate on mice skin, including skin of back and abdomen, were significantly higher than those on snake slough ($P < 0.01$). On snake slough, the cumulative permeating amounts and transdermal diffusion rate of berberine hydrochloride in cream A was significantly higher than cream B ($P = 0.037, 0.028$). The difference of the cumulative permeating amounts between two creams was not significant on mice skin, but the transdermal diffusion rate of cream B was significantly higher than that of cream A on mice skin of back ($P = 0.046$). **Conclusion:** Different skin shows different result. Snake slough was superior to mice skin in optimizing Azone content because of its high sensitivity, less interferences and excellent stability.

Key Words Shanghuang Cream; Snake slough; Back and abdomen skin of mice; Percutaneous Diffusion; Azone

doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2013.10.031

双黄乳膏是由黄连、黄柏等组成的外用乳膏,具有清热解毒、消炎止痛作用,主要用于各种肌腱扭伤、挫伤所致之红肿热痛。本实验就透皮吸收促进剂-氮酮用量对有效成分盐酸小檗碱体外经皮渗透的影响进行考察,为进一步筛选处方做准备。有关双黄巴布剂中盐酸小檗碱透皮吸收的研究已有报道^[1-2],但均采用大鼠皮,本实验利用蛇蜕、小鼠皮肤研究体外经皮扩散的情况。

1 材料与仪器

1.1 材料与试药 黄连、黄柏等饮片 70% 醇提物(自制),氯化钠(北京化工厂,批号 20021122),羊毛脂(北京市昌平石鹰化工厂,991102),液体石蜡(北京求贤化工试剂厂,批号 211003021),月桂氮酮(北京化学试剂

公司,批号 041202),尼泊金乙酯(中国医药公司北京采购供应站,批号 910709),三乙醇胺(北京化学试剂厂,批号 930901),硬脂酸(北京益利精细化学品有限公司,批号 20000717),甘油(北京市嘉利佳工贸有限公司),蒸馏水。乌梢蛇蛇蜕(整条,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)2006-0009)。

1.2 仪器 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(KQ-500,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),电动脱毛器(市购)。

2 方法

2.1 双黄乳膏的制备 取硬脂酸 6.13 g、液体石蜡 10

mL、羊毛脂 1.12 g,氮酮(乳膏 A 加 1 mL,乳膏 B 加 4 mL)置小烧杯中,在 75℃水浴加热并搅拌使其熔化,备用。另取尼泊金乙酯 0.2 g 溶于甘油 2 mL 与三乙醇胺 2 mL、适量水和制成水相,水浴加热至 75℃,备用,将油相缓慢加入水相中,边加边沿同一方向用玻璃棒充分搅拌,使充分乳化成稠膏状,加入适量药物 70% 乙醇提取浸膏研匀,即得含药物浸膏 5% 的乳膏 A、B。

2.2 标准曲线的制备 精密称取盐酸小檗碱 5.0 mg,用 0.9% 的氯化钠溶液溶解,置于 100 mL 容量瓶内定容,制成浓度为 0.05 mg/mL 对照品母液,分别吸取不同量母液于 10 mL 容量瓶内,配制成浓度依次为 0.045、0.02、0.01、0.005、0.001 mg/mL 的对照品溶液,后分别取不同量浓度为 0.005 mg/mL 的对照品溶液置于 10 mL 容量瓶内,配制成浓度依次为 0.000 5、0.000 2、0.000 1 mg/mL 的对照品溶液。将此 8 个浓度的对照品溶液用紫外分光光度计于 265 nm 处测定吸光度,作线性拟合,求出标准曲线方程为 $Y = 61.588X + 0.0044$,相关系数 $r = 0.9999$,说明盐酸小檗碱浓度在 0.000 1 mg/mL 至 0.045 mg/mL 范围内线性关系良好。

2.3 渗透试验用皮肤的处理

2.3.1 蛇蜕的处理 蛇蜕背部剪成适当大小,用生理盐水洗净并浸泡 30 min 后,用滤纸吸干表面水分,备用。

2.3.2 鼠皮的处理 取健康雄性 ICR 小鼠(30±2)g,断脊髓处死,立即剪取背部、腹部皮肤,取下背部、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,用生

理盐水冲洗干净,置生理盐水中,低温冰箱保存备用。实验前自然解冻,并用滤纸吸干后使用。

2.4 经皮扩散操作方法 采用改良扩散池^[3],暴露皮肤面积为 1.668 cm²,接收池容积为 16.4 mL。接收池内放入小转子,将剪好的完整蛇蜕、鼠腹皮、鼠背皮及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,角质层向上,真皮一侧与接收液相贴。用减重法精称双黄乳膏(A/B)0.5 g 均匀、严密涂于扩散池暴露的皮肤表面。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(小转子的)。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生理盐水。

2.5 含量测定方法 以生理盐水作空白对照,释放液立即在 265 nm 处测定吸光度,记录实验数据。浓度较大超出紫外量程的,进行稀释后测定。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盐酸小檗碱的含量,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 表示接收池内生理盐水体积(V = 16.4 mL),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(mg/mL),i = n - 1。计算出累积透皮吸收量 Q(mg)。

3 结果

1) 双黄乳膏 A 与双黄乳膏 B 经蛇蜕和鼠皮透皮释放不同时间累积量见表 1。

表 1 不同浓度氮酮乳膏盐酸小檗碱累积透过量(Q±SD,μg,n=6)

		0.5 h	1 h	2 h	4 h	6 h	8 h	10 h	12 h
蛇蜕	A	6.28±6.99	9.40±7.74	14.80±12.52	23.1±8.17	30.6±11.2	38.9±12.8	47.7±14.9	55.3±17.3
	B	8.57±5.79	9.86±7.84	12.5±6.26	18.5±4.41	22.8±4.94	26.9±6.16	30.9±7.95	36.1±9.07*
小鼠腹皮	A	44.8±3.40	75.9±26.9	146±37.4	305±100	476±160	611±191	731±208	856±239△△
	B	33.9±9.26	58.3±12.9	115±19.6	273±60.2	481±99.0	699±128	915±185	1130±208△△
小鼠背皮	A	54.9±33.8	92.6±57.3	172±101	326±176	492±246	658±326	784±380	902±429△△
	B	53.5±17.6	101±38.9	213±86.7	464±205	775±367	1060±448	1356±526	1589±630△△

注:A:1%氮酮,B:4%氮酮。同类皮肤 4%氮酮乳膏与 1%氮酮乳膏相比,*P<0.05;同种软膏背皮、腹皮分别与蛇蜕相比,△△P<0.01。

表 2 不同浓度氮酮乳膏盐酸小檗碱经皮扩散速率(μg/h,n=6)

		回归方程	r	扩散速率
蛇蜕	A	y = 4.199x + 5.441	0.9991	4.199±1.206
	B	y = 2.364x + 7.930	0.9981	2.364±1.261*
小鼠腹皮	A	y = 72.17x + 13.55	0.9984	72.17±22.04△△
	B	y = 96.62x - 62.62	0.9965	96.62±18.43△△
小鼠背皮	A	y = 75.53x + 24.57	0.9986	75.53±24.57△△
	B	y = 137.2x - 44.50	0.9992	137.2±55.01*△△

注:A 1%氮酮;B 4%氮酮。同类皮肤 4%氮酮乳膏与 1%氮酮乳膏相比,*P<0.05;同种软膏背皮、腹皮与蛇蜕分别与蛇蜕相比,△△P<0.01。

2) 双黄乳膏 A 与 B 经蛇蜕和鼠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 见表 2。截距为负值即表示药物经皮吸收有扩散时滞。

3) 由表 1 可以看出:A 乳膏盐酸小檗碱累积透过量,小鼠腹皮是蛇蜕的 15 倍,小鼠背皮是蛇蜕的 16 倍;B 乳膏盐酸小檗碱累积透过量,小鼠腹皮是蛇蜕的 31 倍,小鼠背皮是蛇蜕的 44 倍。累积透过量为小鼠背皮>小鼠腹皮>蛇蜕。用小鼠腹部和背部皮肤进行

经皮扩散试验,虽然 A 乳膏累积透过量均呈现大于 B 乳膏的趋势,但结果无统计学意义。采用蛇蜕时, A 乳膏累积透过量大于 B 乳膏,结果有统计学意义 ($P = 0.037$)。

4 讨论

氮酮为目前使用较多的促透剂,用量小、无毒且对皮肤的刺激性很低,对亲水性或疏水性化合物均有较强的透皮吸收促进作用^[4-5],使用浓度为 0.1% ~ 10%,常用浓度为 0.5% ~ 2%^[6]。前人研究发现氮酮对不同药物的透皮吸收影响不同,其用量并非越高越好,故对试验药物应选择最佳用量^[7-8]。本试验考察了两种不同浓度的氮酮对于双黄乳膏 12 h 累积透过量 and 经皮扩散速率的影响,发现蛇蜕无论从累积透过量还是经皮扩散速率均能较好地地区分两者的差异,证明氮酮含量 4% 的乳膏中有效成分透皮吸收量和速率均低于氮酮含量 1% 的乳膏。而小鼠无论背皮还是腹皮试验结果虽能看出氮酮含量 4% 的乳膏透皮存在时滞,但从累积透过量看差异无统计学意义,对两者的区分度不佳。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,目前认为小猪、猴和蛇蜕等与人皮肤较为相似^[9],但由于皮肤来源的关系,大鼠、小鼠和兔皮仍常用作透皮吸收实验皮肤,豚鼠皮也偶见报道^[6]。本试验也说明透皮吸收试验选取皮肤不同,会影响试验的结论。分析其原因如下。

蛇蜕是一种无毛囊的纯角质层,厚度为 10 ~ 20 μm ,分 β 层(以 β 角蛋白为主)、中层(以 α 角蛋白和类脂为主)和 α 层(以 α 角蛋白为主)。 β 层对透过性影响不大,中层与 α 层是透过的主要屏障,中层结构与入角质层极相似,因此在结构、组成、脂类含量、水分渗透性等方面与人类表皮角质层类似。据文献报道,药物透过蛇蜕的渗透系数与其透过人皮的渗透系数相似或常略低,而其它动物表皮的渗透系数则远大于人皮肤^[10-11]。有实验表明氮酮对蛇蜕的促透作用比小鼠皮更显著,认为其主要作用部位可能是角质层^[12],这可能是采用蛇蜕做透过试验对氮酮含量差异更敏感的原因之一。其次,蛇蜕表皮为一个完整薄层,能够制备多个样品;单个动物也可提供多次蜕皮,从而消除个体差异;蜕皮可在室温下保存。蛇蜕缺少毛囊,可以避免经毛囊路径的渗透,实验结果稳定,个体差异小,容易比出差异。而小鼠的皮肤由于存在毛囊,在制备鼠皮时需要进行剃毛等操作,容易发生肉眼难以发现的皮肤损伤或剃毛不净^[11],且同只小鼠可制备的皮

张数量受到限制,因此引入较大的个体差异,实验结果不易稳定^[13],难以比出差异。故蛇蜕作为体外透皮实验的扩散膜其实实验数据会更有实际意义。因此,建议在进行透皮试验时,应根据试验目的选择适宜的皮肤^[14]。

此外,根据多次试验发现,小鼠背部毛远远多于腹部,且背部皮肤较厚,皮下脂肪层和结缔组织较难去净^[15];小鼠腹部皮肤毛少,较薄,皮下结缔组织较易去净,实验结果相比与背部皮肤更稳定,差异较小。因此,小鼠腹部皮肤更适宜于做透皮吸收试验。

本试验选取蛇蜕进行体外透皮试验,并与常用的小鼠背皮与腹皮进行了结果的对比,试验结果可以为双黄乳膏不同处方经人体透皮的差异提供参考。

参考文献

- [1] 楼步青,黄海波. 双黄巴布剂体外透皮促进剂的筛选[J]. 时珍国医国药,2011,22(9):2247-2250.
- [2] 楼步青,黄海波,李玲慧,等. 双黄巴布剂体外经皮渗透实验方法研究[J]. 时珍国医国药,2011,22(10):2490-2492.
- [3] 田璐,张蜀,,林华庆,等. 经皮给药制剂体外透皮扩散试验方法的研究进展[J]. 中国药房,2012,23(29):2761-2764.
- [4] 符棘玉,周本宏,陈明,等. 氮酮对布洛芬乳膏体外透皮吸收的影响[J]. 湖北中医学院学报,2010,12(4):45-47.
- [5] 郭燕蓉,朱蔚,郑媛. 控哮涂剂与传统三伏贴治疗支气管哮喘的疗效观察[J]. 世界中医药,2010,5(3):189-190.
- [6] 张星一. 透皮吸收促进剂在经皮给药系统中的质控和评价方法[J]. 中国新药杂志,2010,19(4):273-276.
- [7] 殷立新,刘宝库. 氮酮对药物透皮吸收的影响[J]. 西北药学杂志,1998,13(2):87-88.
- [8] 张明伟. 正交试验法优选雌二醇凝胶处方[J]. 中国药师,2011,14(7):1019-1020.
- [9] 邱波,王艳,胡建廷,等. SD 大鼠与巴马小型猪的皮肤组织学比较[J]. 中国比较医学杂志,2012,22(6):14-15,20.
- [10] 罗世英,陈华萍. 透皮吸收常用的几种实验动物[J]. 中国药业,2004,13(4):74-75.
- [11] 祖强,赵晓莉,狄留庆,等. 不同种类离体皮肤及人工合成膜对川芎贴膏体外透皮试验的影响[J]. 江苏药学与临床研究,2006,14(6):358-360.
- [12] 王宝华,项振玲,朱学慧,等. 不同扩散膜对布洛芬乳膏体外经皮扩散实验研究[J]. 天津药学,2001,13(4):25-26.
- [13] 赵晓莉,狄留庆,祖强. 药物经皮给药体内外评价方法研究进展[J]. 南京中医药大学学报,2008,24(3):214-216.
- [14] 潘林梅,周静,徐小燕,等. 中药经皮给药制剂促渗透研究策略与应用[J]. 中国药房,2012,23(11):1039-1041.
- [15] 张英丰,汪小根,周莉玲. 大鼠皮肤角质层对青藤碱脂质体贴剂透皮吸收的影响[J]. 中草药,2006,37(9):1322-1324.

(2013-01-28 收稿)