

骨愈搽剂中总黄酮及其单体成分的体外透皮行为研究[△]

高 瑛^{1*}, 赵淑慧^{1#}, 陆 洋², 温 然²(1.北京中医医院顺义医院, 北京 101300; 2.北京中医药大学中药学院, 北京 100102)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)31-4345-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.31.09

摘 要 目的:研究骨愈搽剂中总黄酮及其单体成分的体外透皮行为。方法:采用垂直式Franz扩散池法,以离体小鼠皮肤为透皮屏障进行试验。采用紫外分光光度法测定总黄酮含量,高效液相色谱法测定单体黄酮羟基红花黄色素A(HSYA)含量,考察二者12 h内的体外透皮情况。结果:骨愈搽剂中总黄酮和HSYA的累积渗透量 Q 均随时间 t 的增加而增加,并与 $t^{1/2}$ 有显著相关性,透皮吸收过程均符合Higuchi方程($r=0.995\ 6, 0.999\ 5$),透过速率分别为126.24、47.516 $\mu\text{g}/(\text{cm}^2\cdot\text{h})$ 。结论:骨愈搽剂中总黄酮的透皮行为与HSYA的透皮行为具有相似性,均属于骨架扩散型透皮给药系统,具有长效缓释的特点。

关键词 骨愈搽剂;总黄酮;羟基红花黄色素A;透皮吸收

Transdermal Behavior *in vitro* of Total Flavonoids and Its Monomer Component in Guyu Liniment

GAO Ying¹, ZHAO Shu-hui¹, LU Yang², WEN Ran²(1.Shunyi Hospital, Beijing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Beijing 101300, China; 2.School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To investigate transdermal behavior *in vitro* of total flavonoids and its monomer components in Guyu liniment. METHODS: Vertical Franz diffusion cell was adopted to perform a test on excised mouse skin as transdermal barrier. UV spectrophotometry was used to determine the content of total flavonoids, and HPLC to determine the content of monomer flavonoid hydroxysafflor yellow A (HSYA) to observe transdermal absorption *in vitro* within 12 hours. RESULTS: The accumulative permeation quantity Q of the total flavonoids and HSYA in Guyu liniment increased with time (t), demonstrating a significant correlation with $t^{1/2}$, and transdermal absorption was in conformity with Higuchi equation ($r=0.995\ 6, 0.999\ 5$); permeate flux of total flavonoids and HSYA were 126.24, 47.516 $\mu\text{g}/(\text{cm}^2\cdot\text{h})$. CONCLUSIONS: The transdermal behavior of total flavonoids in Guyu liniment is similar to that of HSYA. Both belong to matrix diffusion-type transdermal drug delivery system, with the characteristic of long-term sustained release.

KEYWORDS Guyu liniment; Total flavonoids; Hydroxysafflor yellow A; Transdermal absorption

骨愈搽剂处方来源于北京中医医院顺义医院骨外科治疗骨性关节炎应用多年的临床经验方,由透骨草、鸡血藤、艾叶、红花等6味中药组成,具有祛风除湿、活血通络的功效,将其制成搽剂后可具有使用携带方便、有效成分含量高且可控、患者依从性好等特点,更加适合现代社会广泛应用。该处方中有效成分以总黄酮为主,其含量最高,单体成分以羟基红花黄色素A(HSYA)最明确,故本研究以总黄酮、HSYA为指标,考察骨愈搽剂的体外透皮情况,并比较两指标成分体外透皮行为的相关性,为骨愈搽剂的研制开发提供数据支持。根据2010年版《中国药典》(一部)^[1]及处方药味透骨草、红花、鸡血藤^[2-4]等相关文献报道,总黄酮的含量以芦丁为对照品,采用紫外-可见分光光度法测定,HSYA的含量采用高效液相色谱法进行测定。

1 材料

1.1 仪器

[△]基金项目:北京市中医药科技项目(No.JJ2011-36)

* 中药师,硕士。研究方向:中药新剂型与新技术研究。E-mail: gaoying446@163.com

通信作者:主管药师。研究方向:药事管理、临床药学。电话: 010-89413333。E-mail:13601119829@163.com

Agilent 1200 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); TU-1810 紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司); BS 110S 电子分析天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司); YB-P6 智能透皮试验仪(天津药典标准仪器厂); KQ5200DA 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

骨愈搽剂[北京中医医院顺义医院自制,批号:20120830,规格:1 g(生药)/ml]; 芦丁对照品(批号:100080-200707,纯度:90.5%,供紫外含量测定用)、HSYA 对照品(批号:111637-201106,纯度:98%)均购自中国食品药品检定研究院;甲醇、乙腈、磷酸为色谱纯,乙醇等其他试剂均为分析纯。

1.3 动物

ICR 小鼠, δ , (20 \pm 2) g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号为 SCXK(京)2012-0001。

2 方法与结果

2.1 小鼠皮肤的处理^[5]

将小鼠断颈处死,取适量脱毛膏均匀涂于小鼠腹部脱去鼠毛,取下腹皮,用干棉花将脂肪及黏液组织擦拭干净,用清水和生理盐水反复冲洗后,包于铝箔纸内,于冰箱冷冻保存备用。实验前自然解冻,目测皮肤完整性,不得有任何破损。

2.2 总黄酮的含量测定

2.2.1 测定方法 将体外透皮试验取出的4 ml接收液置于10 ml量瓶中,以NaNO₂-Al(NO₃)₃为显色剂显色,即加入50 mg/ml NaNO₂溶液0.4 ml,摇匀后静置6 min;再加入100 mg/ml Al(NO₃)₃溶液0.4 ml,摇匀后静置6 min;加入100 mg/ml NaOH溶液4.0 ml,再加50%乙醇定容至刻度,摇匀后再静置15 min。以无接收液的阴性试剂为空白,采用紫外-可见分光光度法在511 nm波长处测定吸光度,计算接收液中总黄酮含量。

2.2.2 标准曲线的制备 精密量取芦丁对照品溶液(0.16 mg/ml)0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0 ml,分别置于10 ml量瓶中,加50%乙醇至4.0 ml,按“2.2.1”项下方法显色,以无芦丁对照品溶液的阴性试剂为空白,分别在511 nm波长处测定吸光度。以质量浓度(*c*)为横坐标、吸光度(*A*)为纵坐标,绘制标准曲线,得回归方程为 $A=10.552c-0.0037$ ($r=0.9997$),芦丁的线性范围为0.008~0.064 mg/ml。

2.2.3 回收率试验 取空白接收液,加入0.008、0.032、0.064 mg/ml的芦丁对照品溶液制备成样品溶液,紫外-可见分光光度法测定总黄酮含量,每组平行操作3份。结果,低、中、高质量浓度样品溶液的回收率分别为(101.74±1.25)%、(97.60±0.76)%、(99.11±0.59)%,RSD分别为1.23%、0.78%、0.60%($n=3$)。

2.2.4 精密度试验 按“2.2.3”项下方法制备低、中、高质量浓度的样品溶液,紫外-可见分光光度法测定,每组重复测定5次。结果,峰面积的RSD分别为3.13%、1.22%、0.97%($n=5$),表明仪器精密度良好。

2.3 HSYA的含量测定^[6]

2.3.1 色谱条件^[7] 色谱柱:Diamondsil™-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-乙腈-0.7%磷酸(26:2:72, V/V/V),流速:1 ml/min;检测波长:403 nm;柱温:30 ℃;进样量:20 μl。

2.3.2 供试品溶液的制备 将接收液用0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液即得供试品溶液。

2.3.3 标准曲线的制备 精密称取HSYA对照品3.03 mg,置于10 ml量瓶中,加25%甲醇稀释至刻度,摇匀,即得母液。分别精密移取适量母液,加25%甲醇制成质量浓度为0.015 15、0.030 3、0.090 9、0.151 5、0.303 0、0.757 5、1.212 0 mg/L的对照品溶液,进样测定,记录色谱。以质量浓度(*c*)为横坐标、峰面积(*A*)为纵坐标,进行回归分析,得回归方程为 $A=58.120c+0.0159$ ($r=0.9999$),HSYA线性范围为0.015 15~1.212 0 mg/L。

2.4 体外透皮试验

采用垂直式Franz扩散池法^[8],使用YB-P6智能透皮试验仪,上室为扩散室,下室为接收室,扩散室容积为23 ml,有效扩散面积为3.14 cm²,恒温水浴加热,温度37 ℃。试验时,接收室加满释放介质(20%乙醇-生理盐水),将小鼠鼠皮附在接收室上,将其固定在两室之间,再将药液加于鼠皮上,排除气泡。磁搅拌转速设定为400 r/min,在设定的时间点1、2、4、6、8、12 h精密移取5 ml接收液,同时补加等量等温的新鲜接收液。取4 ml接收液按“2.2.1”项下方法测定接收液中总黄酮含量;其余接收液用0.45 μm微孔滤膜过滤得到样品,按“2.3.1”项下

方法测定HSYA含量。

根据公式计算不同取样点总黄酮和HSYA的单位面积累积渗透量: $Q=(c_n \times V + \sum_{i=1}^{n-1} c_i \times V_i)/A$,式中 Q 为累积渗透量, A 为有效经皮吸收面积, V 为接收液体积, V_i 为取样体积, c_n 为第 n 次取样测得的接收液中药物的质量浓度; c_i 为第 i ($i \leq n-1$)个取样点测得的接收液中药物的质量浓度; $\sum_{i=1}^{n-1} c_i \times V_i$ 为取样时带走的药物累积和。渗透吸收百分率= $(Q \times A)/W \times 100\%$,其中 W 为给药量。以药物的 Q 对取样时间 t 进行线性回归分析,所得斜率即为透过速率。骨愈搽剂中总黄酮和HSYA的透皮吸收曲线图见图1,12 h内的渗透吸收百分率见表1、表2,平均单位面积累积渗透量-时间模型拟合方程见表3、表4。

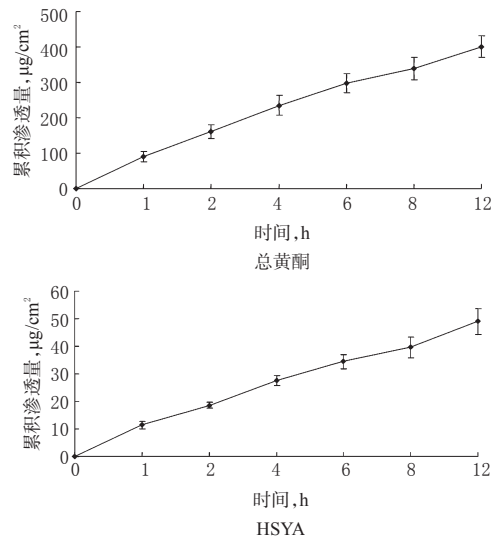


图1 骨愈搽剂中总黄酮和HSYA的渗透吸收曲线图($n=5$)
Fig 1 Transdermal absorption curve of total flavonoids and HSYA in Guyu liniment($n=5$)

表1 12 h内总黄酮的渗透吸收百分率

Tab 1 Transdermal absorption percentage of total flavonoids within 12 h

时间, h	总黄酮累积渗透吸收百分率, %					平均值
	1	2	3	4	5	
1	2.32	1.70	1.89	1.62	1.61	1.83
2	3.84	3.20	3.64	3.28	3.35	3.46
4	5.33	4.54	5.23	5.04	4.72	4.97
6	6.78	5.86	6.23	6.14	5.86	6.17
8	7.88	6.62	6.87	6.93	6.53	6.97
12	9.18	8.10	8.06	8.03	7.76	8.23

表2 12 h内HSYA的渗透吸收百分率

Tab 2 Transdermal absorption percentage of HSYA within 12 h

时间, h	HSYA累积渗透吸收百分率, %					平均值
	1	2	3	4	5	
1	6.43	6.56	7.52	6.99	5.39	6.58
2	10.83	10.49	10.63	11.69	9.79	10.69
4	16.52	15.40	14.76	17.30	15.04	15.81
6	21.34	19.28	18.72	21.14	18.19	19.74
8	24.83	22.49	21.43	24.80	19.95	22.70
12	31.11	28.69	25.86	30.06	24.87	28.12

表3 总黄酮平均单位面积累积渗透量-时间模型拟合方程

Tab 3 Model fitting equation of average accumulative permeation quantity of total flavonoids per unit area-time

拟合方式	模型拟合方程	r
零级方程	$Q=27.342t+103.57$	0.967 0
一级方程	$\ln Q=0.597 \ln t+4.586 3$	0.992 0
Higuchi 方程	$Q=126.24t^{1/2}-22.845$	0.995 6
Weibull 方程	$\ln[1/(1-Q)]=0.008 2 \times \ln t+0.005 1$	0.995 3

表4 HSYA 平均单位面积累积渗透量-时间模型拟合方程

Tab 4 Model fitting equation of average accumulative permeation quantity of HSYA per unit area-time

拟合方式	模型拟合方程	r
零级方程	$Q=10.404t+37.335$	0.981 4
一级方程	$\ln Q=0.579 \ln t+3.628 4$	0.998 0
Higuchi 方程	$Q=47.516t^{1/2}-9.631 5$	0.999 5
Weibull 方程	$\ln[1/(1-Q)]=0.104 5 \times \ln t+0.050 4$	0.981 7

由表3和表4可知,骨愈搽剂中总黄酮和HSYA的透皮吸收过程均符合Higuchi方程,透过速率分别为126.24、47.516 $\mu\text{g}/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})$ 。

3 讨论

黄酮类化合物是一类具有C6-C3-C6结构的低分子质量化合物^[9],具有抗炎、抗氧化、抗衰老、抗肿瘤、抗病毒、镇痛、镇静等多方面药理活性,为骨科常用中草药的活性成分。黄酮类化合物对骨关节炎的治疗作用已有广泛研究,其可抑制滑膜组织的异常增殖、抑制关节软骨病变、保护成骨细胞缺氧损伤、激活成骨细胞而促进骨形成等^[10-14]。因此,开发黄酮类化合物治疗骨科疾病的相关制剂具有重要意义。

骨愈搽剂属于经皮给药系统制剂,黄酮类化学成分主要通过释放到达皮肤表面,进而经过表皮进入血液循环发挥作用,药物成分的透皮吸收速率会直接影响到临床疗效^[15]。因此,药物的渗透吸收百分率是评价经皮给药制剂的重要指标。

本试验研究发现,骨愈搽剂中总黄酮的透皮数据拟合符合Higuchi方程,12 h内渗透吸收百分率为8.23%,透过速率为126.24 $\mu\text{g}/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})$;HSYA的透皮数据拟合亦符合Higuchi方程,12 h内渗透吸收百分率为28.12%,透过速率为47.516 $\mu\text{g}/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})$ 。这说明骨愈搽剂中总黄酮和HSYA的累积渗透量Q均随时间t的增加而增加,并与 $t^{1/2}$ 有显著相关性;总黄酮的透皮行为与单体黄酮HSYA的透皮行为具有相似性,均可用Higuchi方程描述其透皮过程,属于骨架扩散型透皮给药系统,具有长效缓释的特点。然而,是否能用Higuchi方程继续描述骨愈搽剂处方中的其他单体黄酮成分以及Higuchi方程是否为黄酮类化合物透皮吸收过程的通用方程,则需要更进

一步的研究。

参考文献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:30、141.
- [2] 王丹,孙佳明,王贵金,等.紫外分光光度法测定珍珠透骨草中总黄酮的含量[J].世界科学技术:中医药现代化,2007,9(6):61.
- [3] 梁颖,裴瑾,万德光.红花黄色素中主要成分的含量测定[J].中国现代应用药学,2011,28(13):1349.
- [4] 黄锁义,罗建华,张丽丹,等.鸡血藤总黄酮的提取及对羟自由基的清除作用研究[J].时珍国医国药,2007,18(9):2337.
- [5] 刘月环,陆洋,杜守颖,等.宣痹凝胶贴膏剂有效成分的透皮行为研究[J].中国中药杂志,2012,37(9):1202.
- [6] 温然,郝博,高琪,等.骨愈方中羟基红花黄色素A的体外透皮性能考察[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(12):40.
- [7] 王永新,徐荣,白霜.高效液相色谱法测定红花散瘀胶囊中羟基红花黄色素A的含量[J].中国实验方剂学杂志,2007,13(1):12.
- [8] 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.
- [9] 陈白灵.黄酮类化合物的药理活性研究新进展[J].海南医学,2012,23(9):119.
- [10] 许晓林,柳蔚,李世刚,等.黄酮类化合物治疗类风湿性关节炎作用机制的研究进展[J].中药材,2013,36(8):1367.
- [11] 伍海昭,朱敏,詹红生,等.骨碎补总黄酮对去卵巢大鼠骨组织I型胶原表达及骨代谢的影响[J].中医正骨,2014(4):11.
- [12] 陈冠儒.葛根总黄酮对去势大鼠骨质疏松的保护作用[J].安徽医科大学学报,2014,49(6):759.
- [13] 韩桂秋,王鸣刚,陈克明,等.芒柄花素对体外培养成骨细胞缺氧损伤的保护作用[J].中国药理学通报,2011,27(5):671.
- [14] 杨亚军,杨中林,王冬春,等.芦丁与槲皮素对成骨细胞代谢影响的比较研究[J].中药材,2006,29(5):467.
- [15] 傅旭春,梁文权,俞庆森.用理论参数预测药物的经皮渗透性[J].药学学报,2001,36(2):145.

(收稿日期:2015-01-08 修回日期:2015-05-24)

(编辑:邹丽娟)

《中国药房》杂志——中国科技核心期刊,欢迎投稿、订阅