

文章编号:1001-6880(2016)12-1978-05

# 王不留行黄酮苷软膏剂体外透皮吸收研究

侯 豹<sup>1</sup>,陈 婷<sup>2</sup>,张治宣<sup>2</sup>,宫海凤<sup>2</sup>,杨 薇<sup>2</sup>,蔡维维<sup>2</sup>,邱丽颖<sup>1,2\*</sup><sup>1</sup>江南大学药学院天然药物研究室; <sup>2</sup>江南大学无锡医学院,无锡 214122

**摘要:**为了研究渗透吸收促进剂氮酮用量对王不留行黄酮苷软膏剂体外经皮渗透性能的影响及为该化合物经皮给药系统的开发提供参考。本实验采用 HPLC 测定王不留行黄酮苷的含量,流动相为甲醇和水,检测波长 280 nm。选取大鼠背部皮肤,通过 Franz 垂直扩散池考察王不留行黄酮苷软膏剂透皮性能,结果表明 24 h 内,不同浓度的氮酮对王不留行黄酮苷软膏剂透皮吸收均有一定的促进作用,其促渗作用为 1% 氮酮 > 0.5% 氮酮 > 5% 氮酮 > 3% 氮酮 > 0% 氮酮。本实验说明氮酮能促进王不留行黄酮苷软膏剂中的王不留行黄酮苷透皮吸收,以 1% 的氮酮促透效果最佳。

**关键词:**透皮吸收;黄酮苷;软膏剂;氮酮

中图分类号:R283.6

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2016.12.022

## Development and *in vitro* Evaluation of Drug-in Ointment Formulations for Transdermal Delivery of Vaccarin

HOU Bao<sup>1</sup>, CHEN Ting<sup>2</sup>, ZHANG Zhi-xuan<sup>2</sup>, GONG Hai-feng<sup>2</sup>, YANG Wei<sup>2</sup>, CAI Wei-wei<sup>2</sup>, QIU Li-ying<sup>1,2\*</sup><sup>1</sup>Laboratory of Natural Medicine, School of Pharmaceutical Science, Jiangnan University;<sup>2</sup>Wuxi Medical School, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

**Abstract:** The aim of this study was to investigate the effects of different content permeation enhancer azone on *in vitro* transdermal permeation of vaccarin through rat's skin and to provide a reference for development of transdermal drug delivery system of this compound. HPLC was adopted to determine the content of vaccarin with mobile phase of methanol and water, and detection wavelength at 280 nm. The back skin of rats was used, Franz vertical diffusion cell was adopted to investigate transdermal performance of vaccarin, effects of azone, on transdermal permeation of vaccarin were observed. The speed of release medicine of compound vaccarin was different by adding different proportion Azone, and the release speed of vaccarin was 1% Azone > 0.5% Azone > 5% Azone > 3% Azone > 0% Azone. Azone can promote the transdermal absorption of vaccarin in ointment. The effect of promoting penetration of 1% Azone is the best.

**Key words:** transdermal delivery; vaccarin; ointment; azone

王不留行(*Vaccaria segetalis*)为双子叶植物石竹科麦蓝菜的干燥成熟种子,为常见中药,具有下乳消肿、活血通经功效<sup>[1]</sup>。主要含有三萜皂苷、黄酮苷、环肽、类脂和脂肪酸等成分,王不留行黄酮苷为一种黄酮糖苷,为淡黄色颗粒结晶,易溶于甲醇、水、甲醇-水<sup>[2]</sup>。研究表明王不留行黄酮苷具有促内皮细胞增殖的作用<sup>[3]</sup>,可以加快开放性创伤的愈合速度,可用来治疗糖尿病足、冻伤、皲裂和机械创伤等开放性创伤<sup>[4]</sup>。另外在体内活血化瘀,高糖损伤恢复的过程中,血管内皮修复也是一个重要的过程。

Qi P 等人<sup>[5]</sup>为了说明王不留行黄酮苷在体内的主要生物转化途径,按 200 mg/kg 将王不留行黄酮苷单次给药灌胃大鼠,但并未测出王不留行黄酮苷在大鼠血液中的药时曲线,这说明王不留行黄酮苷经过胃肠道消化可能已被分解。因此,本研究拟开发王不留行黄酮苷软膏剂,用于体内活血化瘀,治疗体内血管损伤,方便病人使用。研究渗透吸收促进剂氮酮用量对王不留行黄酮苷软膏剂体外经皮渗透性能的影响,并拟定氮酮的最佳浓度。拓宽王不留行黄酮苷的应用前景,更充分的开发王不留行黄酮苷的药用价值。

## 1 材料与方法

收稿日期:2016-05-17 接受日期:2016-09-09

基金项目:江苏省 2015 年度普通高校研究生实践创新计划(SJL X15-0565);江南大学大学生科研创新项目

\*通讯作者 Tel:86-013861690781;E-mail:qiulydoc@sina.com

## 1.1 材料

王不留行黄酮苷标准品(上海士峰生物科技公司,货号:B10888)。氮酮(郑州益康化工有限公司),硬脂酸、十二烷基硫酸钠、单硬脂酸甘油酯、对羟基苯甲酸乙酯、十八醇、甘油、液状石蜡、凡士林均购自国药集团化学试剂有限公司。甲醇为色谱纯,其它试剂均为分析纯。

## 1.2 动物

离体鼠皮肤的制备 SD 大鼠体重( $200 \pm 10$ )g,由北京华阜康生物科技股份有限公司提供,合格证号 SCXK(京)2009-0004。将大鼠处死,刮去鼠毛,冲洗干净,剪下皮肤,小心剥离脂肪,选取完整的皮肤,用生理盐水冲洗干净,备用。

## 1.3 仪器

Waters e2695 型高效液相色谱仪、2489 UV 检测器、Empower Pro 色谱数据工作站(美国 Waters 公司)、STARTER 3100 pH 计、NDJ-1 旋转粘度计、AL104 型分析天平(梅特勒-托利多仪器有限公司)、TDZ4A 型台式离心机。TB-P6 型改良 Franz 透皮扩散实验仪(上海谐凯科技贸易有限公司)。

## 1.4 实验方法

### 1.4.1 王不留行黄酮苷测定的色谱条件

色谱柱为 Agilent C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相为甲醇-0.3% 磷酸溶液;流速为 0.5 mL/min;检测波长为 280 nm;柱温为 30 °C;进样量为 10 μL。

### 1.4.2 标准曲线的制备

取王不留行黄酮苷对照品 2 mg,精密称定,置 100 mL 量瓶中,用 70% 甲醇溶液溶解并稀释至刻度,摇匀,作为标准品贮备液;再分别量取标准贮备液适量,配制成浓度依次为 0.1、0.2、0.5、1、5、10 μg/mL 的溶液备用。

### 1.4.3 体外透皮吸收实验

将处理好的鼠皮角质层向上固定于 Franz 扩散池上,在接收池中加入 0.9% 的生理盐水,置于恒温水浴的智能透皮实验仪中,设定温度( $37.0 \pm 0.5$ ) °C,转速 300 rpm。平衡 1 h,排尽接收池内的气泡后给药。扩散池供给面积上均匀涂上王不留行黄酮苷软膏剂 1 g,每组平行 3 次,分别在 0、1、2、4、6、9、12、24 h 时吸取接收液 1 mL,并补入同温同体积的接收液,吸取的接收液经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,按 1.4.1 项下色谱条件进样分析。

### 1.4.4 不同浓度促渗剂氮酮对透皮吸收的影响

将 0.1 g 王不留行黄酮苷研细后过 60 目筛备用。取硬脂酸甘油酯 15 g、液状石蜡 20 g、硬脂酸 2 g、十八醇 6 g 加热融化为油相。另取 25 g 甘油及 30 g 蒸馏水加热至 90 °C,再加入 2 g 十二烷基硫酸钠和 0.1 g 羟苯乙酯和适量的氮酮溶解为水相。然后将水相缓缓倒入油相中,边加边搅拌,直至冷凝即得乳剂型基质,将过筛的黄酮苷加入上述基质中搅匀即得。可制得氮酮含量分别为 0、0.5%、1%、3%、5% 王不留行黄酮苷软膏剂,按 1.4.3 项方法进行透皮吸收实验。以单位面积累积透过量(Q)为纵坐标,时间(t)为横坐标,绘制王不留行黄酮苷单位面面积累计透过量-时间曲线。

$$Q = \frac{C_n \times T + \sum_{i=1}^{n-1} C_i \times V_i}{A}$$

式中,Q 为单位面积累积透过量,C<sub>n</sub> 为第 n 个时间点吸取液的质量浓度,C<sub>i</sub> 为第 n-i 个时间点吸取液的质量浓度,V<sub>r</sub> 为接收液总体积(V<sub>r</sub>=7),V<sub>i</sub> 为每次吸取的液体体积,A 为接收池的体积。

### 1.4.5 王不留行黄酮苷软膏剂载药量筛选

在 1.4.4 中筛选出促透皮吸收效果优良浓度的促进剂氮酮,然后按 1.4.4 中制备方法,分别加入 0.1%、0.5%、1% 的王不留行黄酮苷,按照 1.4.3 中方法进行透皮吸收实验。

### 1.4.6 王不留行黄酮苷软膏剂外观性状检测标准

软膏剂应均匀、细腻、具有适当的粘稠性,宜涂布于皮肤或黏膜上并且无刺激。均匀性是指取软膏约 1 g,置于表面光洁的玻璃板中间,小心再盖上同样大小的玻璃板(不要带入气泡),用夹子夹紧四周,对着日光观察,应无颗粒状,色泽均匀、细腻。

### 1.4.7 王不留行黄酮苷软膏剂的稳定性检查

将软膏装入带塞试管中,分别于 55 °C 恒温放置 6 h 与零下 15 °C 恒温放置 24 h,观察应无液化、粗化、分层等现象。将软膏置于 10 mL 离心管中,离心 30 min(3000 rpm)应无分层现象。

### 1.4.8 王不留行黄酮苷软膏剂 pH 测定

将 1 g 软膏稀释至 10 g 去离子水中,然后用 STARTER 3100 pH 计测定其 pH 值。根据中国药典二部附录 VIH 规定的乳剂型基质 PH 要求,W/O 型乳剂基质 pH 应不大于 8.5,O/W 型乳剂基质 pH 应不大于 8.3,但作为开放性创伤的软膏剂其基质 pH 值应该在人体组织液 pH 值(7.0~7.4)范围内,所

以下面实验进行软膏剂配方筛选 pH 值应在(7.0~7.4)范围内。

#### 1.4.9 王不留行黄酮苷软膏剂粘度测定

本研究使用 NDJ-1 旋转粘度计,检测软膏剂的粘度。由于王不留行黄酮苷软膏剂是用于体表的涂抹,所以其适宜粘度应在 $10^2\sim 10^5$  mpa s 范围内。

## 2 结果与分析

### 2.1 标准曲线的制备

按 1.4.1 方法中色谱条件进行测定,记录色谱图,以峰面积 Y 为纵坐标,以相应浓度 X 为横坐标进行线性回归,得到如下回归方程: $Y = 21848x + 5320.1, R^2 = 0.9995$ ,结果表明:王不留行黄酮苷在 $0.1\sim 10 \mu\text{g}/\text{mL}$  浓度范围内与峰面积线性关系良好。

### 2.2 不同含量促渗剂氮酮对透皮吸收的影响结果

考察不同氮酮含量对王不留行黄酮苷累积透皮吸收量的影响,每组平行 3 次,见表 1 和图 1、2。结果显示含 1% 氮酮的软膏剂中王不留行黄酮苷有较快的经皮吸收速率和较高的累积透过量,且在皮肤中的积累量也很多。表明王不留行黄酮苷的经皮吸收速率不随氮酮体积分数的升高而加快。表 2 结果表明含 1% 氮酮的王不留行黄酮苷软膏剂理化性能

稳定。

### 2.3 王不留行黄酮苷软膏剂载药量筛选结果

由结果可知,见表 3 和图 3、4,随着载药量的增加,王不留行黄酮苷的累积透过量和皮肤积累量均有显著提高。众所周知,在经皮给药软膏剂中药物在皮肤中的扩散是依赖于浓度梯度的被动扩散,因此药物在皮肤两侧的浓度梯度是推动药物进入皮肤的动力。浓度越大理应透过量和皮肤积累量也越大。

## 3 讨论与结论

邱宇玉和邱丽颖等人将王不留行黄酮苷涂于生物膜材料上用于开放性创伤的治疗取得了良好的效果<sup>[6]</sup>。在开放性创伤的应用中王不留行黄酮苷的给药量为 $0.0255 \text{ mg}/\text{cm}^2$ ,而 Qi P 等人按 $200 \text{ mg}/\text{kg}$  将王不留行黄酮苷单次给药灌胃大鼠,但并未测出王不留行黄酮苷在大鼠血液中的药时曲线,说明口服给药并不能解决体内血管损伤的问题。本研究中添加 1% 氮酮促进剂的软膏剂的 24 h 累计透过率约为 15%,若按 $200 \text{ mg}/\text{kg}$  给药则 $200 \text{ g}$  大鼠体内王不留行黄酮苷的含量为 $0.03 \text{ mg}/\text{g}$ 。此含量大于开放性创伤给药量,说明透皮给药可能是治疗体内血管损伤的有效途径。

表 1 不同含量氮酮对王不留行黄酮苷软膏剂中黄酮苷透皮吸收结果的影响( $n=3$ )

Table 1 *In vitro* skin permeation parameters and cumulative amount in skin of vaccarin from ointments contain 0.1% (w/w) vaccarin and various contents of azone in O/W matrix across rat skin ( $n=3$ )

氮酮含量 Azone content	黄酮苷含量 Vaccarin content	$Q_{24h} (\text{mg} \cdot \text{cm}^{-2})$ 累积透皮量 Permeated amount	$Q_{24h} (\text{mg} \cdot \text{cm}^{-2})$ 皮肤积累量 Cumulative amount in skin
0%	0.1%	$0.00960 \pm 0.0026$	$0.00120 \pm 0.000230$
0.5%	0.1%	$0.03080 \pm 0.0077$	$0.00761 \pm 0.000700$
1%	0.1%	$0.04250 \pm 0.0027$	$0.00660 \pm 0.000550$
3%	0.1%	$0.02176 \pm 0.0047$	$0.00463 \pm 0.000149$
5%	0.1%	$0.01480 \pm 0.0041$	$0.00696 \pm 0.000152$

表 2 不同含量氮酮软膏剂的理化性质参数

Table 2 Physicochemical properties parameters of ointments with various contents of azone

氮酮含量 Azone content	外观性状 Appearance	稳定性 Stability	pH	黏度( $25^\circ\text{C}$ ) Viscosity
0%	均匀、细腻	55 °C、-15 °C、3000 rpm 不分层	7.26	$7.5 \times 10^4 \text{ mps}$
0.5%	均匀、细腻	55 °C、-15 °C、3000 rpm 不分层	7.37	$7.2 \times 10^4 \text{ mps}$
1%	均匀、细腻	55 °C、-15 °C、3000 rpm 不分层	8.02	$7.1 \times 10^4 \text{ mps}$
3%	均匀、细腻	55 °C、-15 °C、3000 rpm 不分层	7.08	$7.0 \times 10^4 \text{ mps}$
5%	均匀、细腻	55 °C、-15 °C、3000 rpm 不分层	6.85	$6.7 \times 10^4 \text{ mps}$

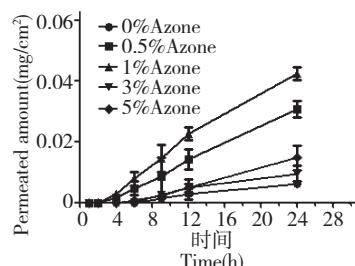


图 1 不同含量氮酮对王不留行黄酮苷软膏剂中黄酮苷累积透过量的影响

Fig. 1 *In vitro* rats skin permeation profiles of vaccarin from ointments containing 0.1% (w/w) vaccarin with no azone (●), 0.5% (w/w) azone (■), 1% (w/w) azone (▲), 3% (w/w) azone (▼) and 5% (w/w) azone (◆) in O/W matrix ( $n=3-6$ )

实验结果显示不同含量促渗剂对王不留行黄酮苷产生的渗透促渗作用差异较大, 氮酮促渗作用较好, 其浓度对透皮累积透过量及在皮肤中积累量

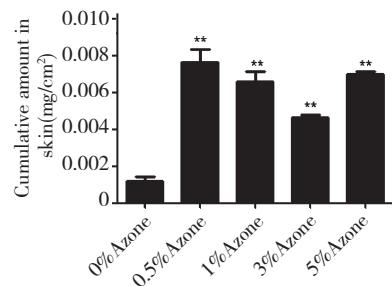


图 2 不同含量氮酮对王不留行黄酮苷软膏剂中黄酮苷累积皮肤积累量的影响

Fig. 2 *In vitro* rats skin permeation cumulative amount in skin profiles of vaccarin from ointments containing 0.1% (w/w) vaccarin with no azone, 0.5% (w/w) azone, 1% (w/w) azone, 3% (w/w) azone, and 5% (w/w) azone in O/W matrix ( $n=3-6$ )

注:与空白对照组比, \*\*  $P < 0.01$

Note: Significantly different from the control (without enhancer) group, \*\*  $P < 0.01$

表 3 王不留行黄酮苷软膏剂中载药量的增加对透皮吸收结果的影响

Table 3 *In vitro* skin permeation parameters and cumulative amount in skin of vaccarin from ointments contain 1% (w/w) azone and various contents of vaccarin in O/W matrix across rat skin

黄酮苷含量 Vaccarin content	氮酮含量 Azone content	$Q_{24h}$ ( $\text{mg} \cdot \text{cm}^2$ ) 累积透皮量 Permeated amount	$Q_{24h}$ ( $\text{mg} \cdot \text{cm}^2$ ) 皮肤积累量 Cumulative amount in skin
0.1%	1%	$0.0422 \pm 0.0035$	$0.0018 \pm 0.00013$
0.5%	1%	$0.2325 \pm 0.0229$	$0.0133 \pm 0.00072$
1%	1%	$0.3308 \pm 0.0650$	$0.0233 \pm 0.00111$

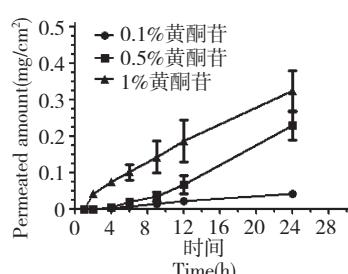


图 3 载药量的增加对王不留行黄酮苷软膏剂中黄酮苷累积透过量的影响

Fig. 3 *In vitro* rats skin permeation profiles of vaccarin from ointments containing azone at concentrations of 1% (w/w) with vaccarin 0.1% (w/w) (●), 0.5% (w/w) vaccarin (■), 1% (w/w) vaccarin (▲) (&) in O/W matrix ( $n=3-6$ ). Each point and vertical bar represents mean and standard deviation, respectively.

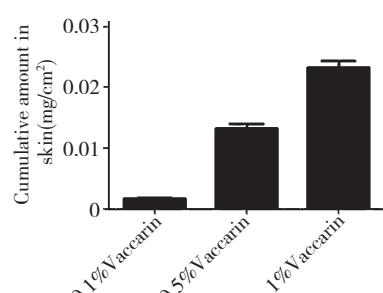


图 4 载药量的增加对王不留行黄酮苷软膏剂中黄酮苷累积皮肤积累量的影响

Fig. 4 *In vitro* rats skin permeation cumulative amount in skin profiles of vaccarin from ointments containing 1% (w/w) azone with 0.1% (w/w) vaccarin, 0.5% (w/w) vaccarin, and 1% (w/w) vaccarin, in O/W matrix ( $n=3-6$ ). Each point and vertical bar represents mean and standard deviation, respectively.

亦有一定影响,以1%氮酮的效果最好,说明氮酮的促渗作用在低体积分数范围内呈浓度依赖性,达到一定浓度时促渗作用降低。氮酮是一种高效、无毒无臭、无刺激性的皮肤渗透促进剂,渗入皮肤中能影响表皮角质层中扁平角化细胞的有序叠集结构,氮酮促渗作用是通过破坏角质层间质,使表皮细胞间裂隙增加,从而降低药物透过角质层的阻力<sup>[7]</sup>。

在体外渗透实验中,磁力搅拌器转速的范围通常为100~500 rpm,为确定最佳转速,但是,为了更好地模拟体内环境,将搅拌器转速定为300 rpm。另外,一般认为扩散池夹层水浴温度应使皮肤表面温度接近于生理温度32 °C,单室扩散池温度维持在37 °C,因此,将温度控制在(37 ± 1) °C<sup>[8]</sup>。此外,在实验过程中,要保证接收液液面充分接触到离体鼠皮,并需防止气泡的产生;定时补充的接收液需保持与透皮装置中的接收液的温度一致,以免影响透皮效果。

本研究采用0.9%的生理盐水作为溶媒,将水溶性的王不留行黄酮苷制备成乳膏,选择氮酮作为皮肤渗透促进剂,有效解决制剂学问题,同时达到理想的渗透作用。王不留行黄酮苷透皮给药系统的研究,为治疗体内血管损伤导致的疾病及跌打损伤的治愈,提供了更为安全、有效、依从性好的给药途径。

本研究是首次提出将王不留行黄酮苷透皮给药应用于治疗体内血管损伤导致的疾病。为以后体内血管损伤的治疗途径打开了思路,为口服易被分解的药物透皮给药做出了良好的探索。

## 参考文献

- 1 Chinese Pharmacopoeia(国家药典委员会). Pharmacopoeia of People's Republic of China (中华人民共和国药典). Beijing: China Medical Science Press, 2010. Vol I, 49-51.
- 2 Meng H (孟贺), Chen YP (陈玉平), Qin WJ (秦文杰), et al. Cowherb seed medium yellow ketone glucoside of separation and identification. *China Tradit Herb Drug* (中草药), 2011, 42: 874-876.
- 3 Xie FS, Cai WW, Liu YL, et al. Vaccarin promotes endothelial cell proliferation in association with neovascularization *in vitro* and *in vivo*. *Molecular Medicine Reports*, 2016, Accepted.
- 4 Han J (韩晋), Li N (李娜), Liu D (刘冬), et al. Compound *Ganoderma lucidum* cream of rabbit ears Frostbite slightly the preliminary research on the therapeutic effect. *Pharm J China* (中国药学杂志), 2012, 9: 689-692.
- 5 Qi P, Fan MS, Li ZX, et al. *In vivo* metabolism study of vaccarin in rat using HPLC-LTQ-MSn. *Biomed Chromatogr*, 2013, 27: 96-101.
- 6 Qiu Y, Qiu L, Cui J, Wei Q. Bacterial cellulose and bacterial cellulose-vaccarin membranes for wound healing. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2016, 59: 303-309.
- 7 Qi Y (祁艳), Chen J (陈军), Li L (李磊), et al. Shortness of different permeability agent of strychnine patch shadow *in vitro* transdermal absorption. *Chin Pharm* (中国药房), 2011, 22: 195-197.
- 8 Yu BT (于波涛), Fan KH (范开华), Jin WH (金伟华), et al. Azone dosage on magnincream research on the effects of *in vitro* transdermal absorption. *Southwest Nat Defense Med* (西南国防医药), 2011, 3: 250-252.

(上接第1902页)

- 17 Wang C, Chen X, Ding X, et al. Exendin-4 promotes beta cell proliferation via PI3k/Akt signalling pathway. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 35: 2223-2232.
- 18 Hughes E, Huang C. Participation of Akt, menin, and p21 in

pregnancyinduced beta-cell proliferation. *Endocrinology*, 2011, 152: 847-855.

- 19 Zhao Y, Wang Y, Zhu WG. Applications of post-translational modifications of FoxO family proteins in biological functions. *J Mol Cell Biol*, 2011, 3: 276-282.