

[制 剂]

参黄凝胶膏剂中丁香挥发油对大黄酸的经皮渗透作用

王秀敏， 封 玲， 丁美红， 孙秋华*， 石森林*
(浙江中医药大学，浙江 杭州 310053)

摘要：目的 探讨参黄凝胶膏剂中丁香挥发油对大黄酸的经皮渗透作用。**方法** 采用改良 Franz 扩散池法，考察丁香挥发油对大黄酸透皮特性的影响。以大黄酸释放度为评价指标，立式扩散池结合透析袋法研究参黄凝胶膏剂体外释放行为。**结果** 3% 丁香挥发油促透效果强于 3% 氮酮、3% 薄荷挥发油，累积渗透量 $(120.11 \pm 8.84) \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ，增渗倍数 2.93。体外释放行为与 Weibull 模型拟合度最高 ($r=0.999\ 8$)。**结论** 丁香挥发油能显著增加参黄凝胶膏剂中大黄酸的透皮吸收。

关键词：参黄凝胶膏剂；丁香挥发油；大黄酸；经皮渗透

中图分类号：R969.1 文献标志码：A 文章编号：1001-1528(2019)02-0245-05
doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2019.02.001

Percutaneous penetration effects of *Caryophylli Flos* volatile oil on rhein in Shenhuang Gel Ointment

WANG Xiu-min, FENG Ling, DING Mei-hong, SUN Qiu-hua*, SHI Sen-lin*
(Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

ABSTRACT: **AIM** To explore the percutaneous penetration effects of *Caryophylli Flos* volatile oil on rhein in Shenhuang Gel Ointment. **METHODS** Modified Franz diffusion cell method was applied to investigating the effects of *Caryophylli Flos* volatile oil on rhein transdermal characteristic. With rhein release rate as an evaluation index, vertical diffusion cell combined with dialysis bag method was used to study the *in vitro* release behaviors of Shenhuang Gel Ointment. **RESULTS** Three percent *Caryophylli Flos volatile oil demonstrated stronger penetration enhancement effect than* 3% azone and 3% *Menthae haplocalycis Herba* volatile oil, with the accumulative permeation quantity and enhancement ratio of $(120.11 \pm 8.84) \mu\text{g}/\text{cm}^2$ and 2.93, respectively. The *in vitro* release behaviors exhibited the highest fitting degree with Weibull model ($r = 0.999\ 8$). **CONCLUSION** *Caryophylli Flos* volatile oil can significantly increase the percutaneous absorption of rhein in Shenhuang Gel Ointment.

KEY WORDS: Shenhuang Gel Ointment; *Caryophylli Flos* volatile oil; rhein; percutaneous penetration

参黄方是国家级名老中医徐志瑛教授根据临证经验加减小承气汤而来，由生晒参、丹参、大黄、丁香等药材组成，方中君药大黄性苦寒，具有较强的泻下作用，故佐以丁香（温中降逆）、吴茱萸（散寒止痛、温中止呕）共奏和胃降逆、化浊止呕之功效，可解诸多泻下药寒凉之虞。临床上，常以参黄方散剂敷贴于神阙穴以治疗术后胃肠功能不

全^[1-4]，但其以经皮方式给药，需不间断更换，患者顺应性差，故需要一种刺激性小、黏附性好的制剂取而代之^[5]。

前期课题组以参黄方为基础，开发出一种新型透皮制剂——凝胶膏剂，它具有贴敷舒适、可反复粘贴、用药方便、减少毒副作用等优点^[6]，可为临床制剂开发提供一定参考。但凝胶膏剂作为一种

收稿日期：2018-08-22
基金项目：国家自然科学基金项目（81470194）
作者简介：王秀敏（1990—），女，硕士生，从事中药制剂新剂型、新技术研究。E-mail: 1763316934@qq.com
* 通信作者：孙秋华（1961—），女，教授，博士生导师，从事中西医结合研究。E-mail: sqh807@163.com
石森林（1971—），男，教授，从事中药制剂新剂型、新技术研究。E-mail: pjstone@163.com

新型透皮给药制剂，其药物经皮吸收仍会受到皮肤、药物、剂型三方面的影响（广义），而且对于中药复方来说，其中各配伍药材主要成分的理化性质与主药经皮肤的吸收、分布过程密切相关，需进行深入研究^[7-8]。目前，对参黄方的研究大多集中在药效、药理等方面^[9-10]，鲜有从配伍及经皮吸收角度的报道，故实验考察参黄凝胶膏剂中丁香药效成分丁香挥发油对大黄有效成分大黄酸的经皮渗透作用，并对凝胶膏剂进行体外释放行为研究，以期对相关经皮给药制剂研发提供参考依据。

1 材料

1.1 仪器 XS105 电子天平、FE20 实验室 PH 计 [梅特勒-托利多仪器（上海）有限公司]；Agilent 1200 Series 高效液相色谱仪（美国 Agilent 公司）；KQ-300DB 数控超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）；TK-12D 透皮扩散试验仪（上海锴凯科技贸易有限公司）；DK-S26 电热恒温水浴锅、DZF-6050 真空干燥箱（上海精宏实验设备有限公司）；WH-861 涡旋混合器（太仓市科教仪器厂）。

1.2 试药 大黄酸（批号 110757-200206）、厚朴酚（批号 110729-201513）、大黄素（批号 110756-200110）、大黄酚（批号 110796-201319）对照品（中国食品药品检定研究院）。参黄凝胶膏剂（自制）。丁香购自浙江中医药大学中药饮片有限公司，经浙江中医药大学中药资源与鉴定教研室陈孔荣副教授鉴定为正品。液相用甲醇、磷酸为色谱纯（美国 Tedia 公司）；其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 含有量测定

2.1.1 对照品溶液制备 精密称取大黄酸、厚朴酚、大黄素、大黄酚对照品适量，置于 10 mL 量瓶中，甲醇溶解并稀释至刻度，分别配制成质量浓度 0.041 4、0.065 8、0.092 8、0.099 9 mg/mL 溶液，摇匀，即得。

2.1.2 参黄凝胶膏剂制备 称取处方量参黄提取物、明胶、CMC-Na、甘油、聚丙烯酸钠、甘羟铝、蒸馏水，先将明胶、CMC-Na（配制成 2% 溶液）、蒸馏水混合，然后加入参黄提取物，再将混合好的甘油、聚丙烯酸钠、甘羟铝逐滴加入，搅拌均匀，涂布，即得。

2.1.3 供试品溶液制备 取参黄凝胶膏剂 1 g，置于 100 mL 广口瓶中，加 25 mL 甲醇，称定质量，超声（300 W、25 kHz）1.5 h，放冷，甲醇补足减少的质量，摇匀，滤过，续滤液甲醇稀释，摇匀，

0.45 μm 微孔滤膜过滤，取续滤液，即得。

2.1.4 色谱条件与系统适应性试验 Kromasil C₁₈ 色谱柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）；流动相甲醇（A）-0.1% 磷酸（B），梯度洗脱（0~13 min，78% A；13~25 min，78%~85% A；25~40 min，85% A）；体积流量 1.0 mL/min；检测波长 254 nm；柱温 30℃；进样量 10 μL。然后，分别吸取对照品、供试品溶液，在上述色谱条件下进行 HPLC 分析，结果见图 1。由图可知，大黄酸、厚朴酚、大黄素、大黄酚色谱峰与其干扰峰的分离度均大于 1.5，理论塔板数按大黄酸计不低于 9 000，满足分析检测要求。

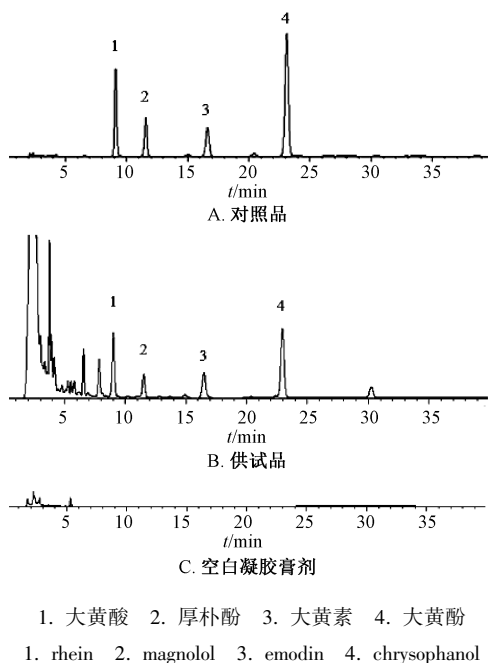


图 1 各成分 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of various constituents

2.1.5 专属性试验 精密称取空白、含药凝胶膏剂各 1 g，按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液，在“2.1.4”项色谱条件下进样测定，结果见图 1。由图可知，空白基质对成分测定无干扰，表明该方法专属性良好。

2.1.6 线性关系考察 对照品溶液在“2.1.4”项色谱条件下进样 1、2、5、10、15、20 μL 测定，以进样量为横坐标（X），峰面积为纵坐标（Y）进行回归，得到方程分别为大黄酸 $Y = 3\,839.3X - 0.707\,6$ ($r = 1.000\,0$)、厚朴酚 $Y = 1\,633.9X + 0.685\,9$ ($r = 1.000\,0$)、大黄素 $Y = 3\,575.1X - 0.763\,0$ ($r = 1.000\,0$)、大黄酚 $Y = 4\,687.1X - 1.043\,2$ ($r = 1.000\,0$)，分别在 8.28~165.60、9.88~197.51、4.64~92.80、14.98~299.60 ng 范围内呈良好的线性

关系。

2.1.7 精密度试验 精密吸取对照品溶液，在“2.1.4”项色谱条件下进样测定6次，每次10 μL，测得大黄酸、厚朴酚、大黄素、大黄酚峰面积RSD分别为0.30%、0.75%、0.17%、0.38%、0.31%，表明仪器精密度良好。

2.1.8 稳定性试验 按“2.1.3”项下制备供试品溶液，室温下于0、2、4、6、8、10、12、24 h在“2.1.4”项色谱条件下进样测定，测得大黄酸、厚朴酚、大黄素、大黄酚峰面积RSD分别为1.82%、1.19%、0.85%、0.72%，表明溶液在24 h内稳定性良好。

2.1.9 重复性试验 精密称取参黄凝胶膏剂6份，按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液，在“2.1.4”项色谱条件下进样测定，测得大黄酸、厚朴酚、大黄素、大黄酚含有量RSD分别为1.97%、1.92%、1.84%、1.17%，表明该方法重复性良好。

2.1.10 加样回收率试验 精密称取含有量已知的参黄凝胶膏剂20 mg，共9份，置于25 mL量瓶中，精密加入适量高、中、低质量浓度对照品溶液，甲醇定容至刻度，按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液，在“2.1.4”项色谱条件下进样测定，计算回收率。结果，大黄酸、厚朴酚、大黄素、大黄酚平均加样回收率分别为99.10%、99.96%、99.00%、98.11%，RSD分别为1.63%、2.20%、1.77%、1.72%。

2.2 丁香挥发油制备 采用水蒸气蒸馏法，将适量丁香饮片加10倍量水提取6 h，收集挥发油，即得。

2.3 经皮渗透作用考察

2.3.1 离体皮肤制备 戊巴比妥麻醉SD大鼠后，电动脱毛器小心剃除皮肤被毛（不得有划痕），将皮肤剪成直径25 mm的小片，平铺在干净玻璃板上，角质层向下，小刀片或其他钝器沾生理盐水剔除皮下脂肪，用生理盐水反复漂洗干净，滤纸吸干，置于铝箔纸上，置于-80℃冰箱中保存备用。于实验前1 d取出，自然解冻，使用前生理盐水反复淋洗至澄清。

2.3.2 含药凝胶膏剂制备 取处方量参黄提取物、明胶、CMC-Na、甘油、聚丙烯酸钠、甘羟铝、蒸馏水，先将明胶、CMC-Na（配制成2%溶液）、蒸馏水混合，然后加入参黄提取物，再将混合好的甘油、聚丙烯酸钠、甘羟铝逐滴加入，搅拌均匀，分

别加入3%氮酮、3%丁香挥发油、3%薄荷挥发油、3%氮酮+丁香挥发油油，涂布，即得。

2.3.3 体外透皮试验 采用TK-12D改良Franz透皮扩散试验仪，扩散池容积7.5 mL，内径2.0 cm，有效渗透面积3.14 cm²，取离体皮肤固定于扩散池结合部，皮肤角质层面面向供给池，池中加入不同含药凝胶膏剂；接受池内加入接受液（含20%乙醇的生理盐水），水浴温度（32±0.5）℃，转速300 r/min。于0.5、1、2、4、6、8、10、12、24 h各取样1 mL，等温度含20%乙醇的生理盐水补充至原体积量，样品过0.45 μm微孔滤膜，取续滤液，在“2.1.4”项色谱条件下进样测定大黄酸含有量，计算其累积透过量及稳态透过速率。

2.3.4 数据处理与分析 按式（1）、（2）计算校正药物浓度（ $C_{n校}$ ）、单位面积累积渗透量（ Q_n ），其中 C_i 为 t 时间前药物测定浓度， C_n 为 t 时间药物测定浓度， V 为接受池中接受液体积， A 为扩散池面积；以不同时间点的 Q_n 对时间 t 绘图，其直线部分斜率即为稳态透皮速率（ J_s ）；计算增渗倍数，公式为增渗倍数= $J_{s(含促透剂)}/J_{s(阴性对照)}$ 。见图2、表1。

$$C_{n校} = C_n + \sum_{i=1}^{n-1} C_i$$
$$Q_n = C_{n校} \cdot V/A$$

(1)

(2)

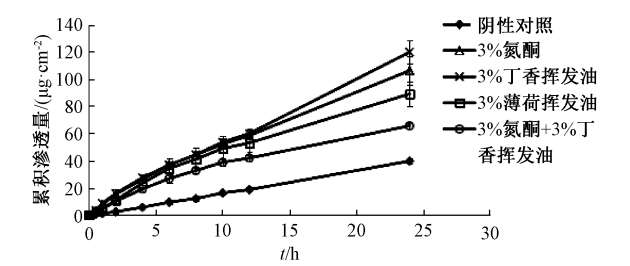


图2 大黄酸累积渗透量-时间曲线

Fig. 2 Accumulative permeation quantity-time curves for rhein

由表可知，不同凝胶膏剂中大黄酸稳态透皮速率与渗透系数依次为3%丁香挥发油>3%氮酮>3%薄荷挥发油>3%氮酮+3%丁香挥发油>阴性对照，即3%丁香挥发油促透效果最好， Q_n 、增渗倍数约为阴性对照（未加促渗剂凝胶膏剂）的3倍。

2.4 体外释放行为评价 取3批凝胶膏剂，以截留分子量3 500 Da透析袋为半透膜，立式扩散池法进行体外释放度试验，释放介质生理盐水，转速300 r/min，温度（32±0.5）℃。将凝胶膏剂剪成面积3.14 cm²的圆形小片，紧贴于半透膜上，于

表 1 大黄酸透皮吸收动力学参数

Tab. 1 Kinetic parameters for rhein percutaneous absorption

组别	回归方程	<i>r</i>	$Q_n/(\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2})$	$J_s/[\mu\text{g}\cdot(\text{cm}^2\cdot\text{h})^{-1}]$	增渗倍数
凝胶膏剂组	$Q_n=1.663\ 2t-0.720\ 4$	0.999 3	39.67±2.20	1.663	1.00
3% 氮酮+凝胶膏剂组	$Q_n=4.392\ 5t+5.408\ 3$	0.992 9	106.45±10.48**	4.393**	2.64
3% 丁香挥发油+凝胶膏剂组	$Q_n=4.877\ 7t+4.086\ 7$	0.997 1	120.11±8.84**	4.878**	2.93
3% 薄荷挥发油+凝胶膏剂组	$Q_n=3.805\ 9t+5.051\ 4$	0.983 2	89.26±9.15**	3.806**	2.29
(3% 氮酮+3% 丁香挥发油)+凝胶膏剂组	$Q_n=2.798\ 5t+5.274\ 9$	0.974 8	65.67±1.95**	2.799**	1.68

注:与凝胶膏剂组比较,***P*<0.01

0.5、1、2、4、6、8、12、24 h 各取样 1 mL,同时补加 1 mL 生理盐水,样品用 0.22 μm 微孔滤膜过滤,在上述条件下进样分析,记录峰面积,计算累积释放度,结果见图 3。

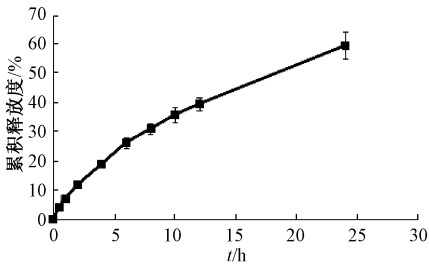


图 3 大黄酸体外释药曲线

Fig. 3 *In vitro* drug release curve for rhein

然后,将体外释药结果进行模型拟合,结果见表 2。由表可知,大黄酸体外释放行为与 Weibull 模型拟合度最高,表明参黄凝胶膏剂具有一定缓释作用。

表 2 模型拟合结果

Tab. 2 Results of model fitting

模型	拟合方程	<i>r</i>
一级方程	$\ln(1-Q)=-0.036\ 4t-0.058$	0.996 4
零级方程	$Q=0.023\ 4t+0.084\ 3$	0.974 6
Higuchi 方程	$Q=0.133\ 4t^{1/2}-0.065\ 1$	0.999 2
Ritger-peppas 方程	$\ln Q=0.695\ 9\ln t-2.647$	0.998 6
Weibull 方程	$\ln[-\ln(1-Q)]=0.786\ 4\ln t-2.622$	0.999 8

3 讨论

前期课题组对参黄方中丁香挥发油用量进行考察,发现 3% 丁香挥发油配伍对大黄酸的透皮吸收作用最佳。本实验在此基础上以 3% 氮酮、3% 薄荷挥发油为对照,以大黄酸稳态透皮速率与渗透系数为指标评价丁香挥发油对大黄酸的透皮特性,结果显示含 3% 丁香挥发油的凝胶膏剂对大黄酸透皮吸收最佳,累积渗透量最高。但本实验将丁香挥发油与氮酮配伍时,其渗透效果反而低于单用两者,推测氮酮可能是通过增加角质层类脂流动性和溶解皮肤类脂来增加药物透皮吸收^[11],对亲脂性药物的促透作用不及亲水性药物强,而参黄方中成分复

杂,并有大量亲脂性成分(如大黄酸),而丁香挥发油中的主要成分为亲脂性丁香酚,和氮酮共同作用时与方中其他成分相互影响,从而减少大黄酸透皮吸收。

丁香主要成分为挥发油,研究发现它也有促透皮吸收的作用^[12-13]。本实验从配伍角度进行考察,发现含 3% 丁香挥发油的参黄凝胶膏剂对大黄酸促渗效果最佳,表明中药配伍理论具有一定科学性,丁香作为方中药物能起到“药辅合一”的作用。

参黄凝胶膏剂由中药复方提取物直接制成,有效成分较多,大黄酸作为君药大黄的主要成分,其含量较其他成分高。但结合前期报道^[14],本实验仅以大黄酸为指标成分考察其释放特性,难以反映全方整体释放特性,故今后有必要进一步研究参黄方中其他药材配伍君药大黄时对大黄酸经皮渗透的影响。

参考文献:

[1] 俞慧仙,应学,裴华森,等.参黄散敷神阙穴促胃癌术后胃肠功能不全早期康复的临床研究[J].中华中医药杂志,2013,28(10):3131-3133.

[2] 魏星,裴华森,张琪,等.参黄散贴剂对腹部术后胃肠功能不全患者的促康复作用——110 例前瞻性多中心随机对照临床研究[J].中医杂志,2014,55(5):386-390.

[3] 郑超.参黄膏对术后气滞血瘀型胃肠功能不全的促康复临床研究[D].杭州:浙江大学,2013.

[4] 陈杰,魏星,周济春,等.参黄散敷脐对肿瘤根治术后气滞血瘀型胃肠功能不全的促康复临床初步研究[J].浙江中医药大学学报,2012,36(4):372-374.

[5] 宋立华,刘淑芝.中药凝胶膏剂的研究进展分析[J].中国实验方剂学杂志,2015,21(22):133-136.

[6] 丁美红,封玲,孙秋华,等.基于多指标综合评价法优化参黄散提取工艺[J].中国现代应用药学,2016,33(12):1497-1502.

[7] 陈建萍,吴伟康,张敏生,等.中药复方配伍规律研究的思路与方法[J].中国实验方剂学杂志,2000,6(1):1-4.

[8] 李镇,容悦堂,王淑美,等.中药组方配伍的研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2015,21(7):223-226.

[9] 徐小宏,陈友雷,魏星,等.参黄散对术后肠动力障碍

大鼠胃肠功能及小肠 ICAM-1、IL-10、IL-1 β 和 iNOS 表达的影响[J]. 浙江中医药大学学报, 2015, 39(11): 777-781.

[10] 丁美红, 吴怡, 万浩芳, 等. 参黄散经神阙穴与非穴位敷贴在新西兰兔血浆中的药代动力学比较[J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(6): 2321-2326.

[11] 王晖, 许卫铭, 薄荷醇及其二组分系统对 5-氟脲嘧啶经皮渗透和贮库效应的影响[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2003, 8(4): 422-424.

[12] 王艳宏, 刘书博, 王锐, 等. 中药挥发油促透皮吸收及透皮吸收作用的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(3): 192-199.

[13] 赵婷婷, 张彤, 项乐源, 等. 当归、丁香挥发油的促透皮吸收作用[J]. 中成药, 2016, 38(9): 1923-1929.

[14] 封玲, 丁美红, 沈勤, 等. 大黄酸神阙穴给药经皮渗透性的影响因素研究与初步机制探讨[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(8): 1546-1552.

金银花多酚氧化酶抑制剂的筛选

李菁, 马东来, 刘宏伟, 冯建明, 李静娟, 郑玉光*
(河北中医学院药学院, 河北 石家庄 050200)

摘要: **目的** 筛选金银花多酚氧化酶抑制剂。 **方法** 以 pH 值、浸泡时间、料液比为影响因素, 木犀草苷、绿原酸含有量为评价指标, 单因素试验筛选单一抑制剂。以所筛选单一抑制剂质量浓度为影响因素, 木犀草苷含有量提高率为评价指标, Box-Behnken 响应面法优化复合抑制剂组成。 **结果** 维生素 C、 β -环糊精、曲酸、食盐对金银花褐变的抑制作用较好, 最佳 pH 值为 5, 浸泡时间为 120 min, 料液比为 1 : 8。复合抑制剂最佳组成为 0.2 mg/mL 维生素 C, 2.3 mg/mL β -环糊精, 8.0 mg/mL 曲酸, 10.6 mg/mL 食盐, 木犀草苷、绿原酸含有量提高率分别为 55.61%、9.79%。 **结论** 与单一抑制剂比较, 多酚氧化酶复合抑制剂可明显提高金银花中木犀草苷含有量, 对该药材产地加工具有较高的实用价值。

关键词: 金银花; 多酚氧化酶; 抑制剂; 单因素试验; Box-Behnken 响应面法

中图分类号: Q55 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2019)02-0249-07

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2019.02.002

Screening of polyphenol oxidase inhibitor from *Lonicerae japonicae Flos*

LI Jing, MA Dong-lai, LIU Hong-wei, FENG Jian-ming, LI Jing-juan, ZHENG Yu-guang*
(College of Pharmacy, Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang 050200, China)

ABSTRACT: **AIM** To screen polyphenol oxidase inhibitor from *Lonicerae japonicae Flos*. **METHODS** With pH value, soaking time and solid-liquid ratio as influencing factors, galuteolin and chlorogenic acid contents as evaluation indices, single factor test was applied to screening single inhibitors. With the concentrations of screened single inhibitors as influencing factors, increasing rate of galuteolin content as an evaluation index, Box-Behnken response surface method was adopted in the optimization of compound inhibitor composition. **RESULTS** Vitamin C, β -cyclodextrin, kojic acid and salt demonstrated good inhibitory effects on *Lonicerae japonicae Flos* browning, with the optimal pH value, soaking time and solid-liquid ratio of 5, 120 min and 1 : 8, respectively. The optimal compound inhibitor composition was determined to be 0.2 mg/mL vitamin C, 2.3 mg/mL β -cyclodextrin, 8.0 mg/mL kojic acid and 10.6 mg/mL salt, the increasing rates of galuteolin and chlorogenic acid contents were 55.61% and 9.79%, respectively. **CONCLUSION** Compared with single inhibitor, the compound polyphenol

收稿日期: 2018-02-23
基金项目: 全国中药炮制技术传承基地建设(7002016012073); 河北省现代农业产业技术体系中药材产业创新团队建设(2017041458-2); 河北省大学生创新创业项目(201614432034)
作者简介: 李菁(1971—), 女, 硕士, 副教授, 研究方向为天然药物化学。Tel: 13032604492, E-mail: 1929774800@qq.com
* 通信作者: 郑玉光(1973—), 男, 硕士, 教授, 从事中药资源研究与鉴定工作。E-mail: 2685268442@qq.com