



良肤乳膏小鼠皮肤药物动力学的研究

王森¹, 欧水平^{1,2}, 管咏梅¹, 吴德智¹, 陈丽华¹, 朱卫丰^{1*}

(1. 江西中医学院 现代中药制剂教育部重点实验室, 江西 南昌 330004;

2. 成都中医药大学, 四川 成都 611173)

[摘要] 目的: 考察良肤乳膏中丹皮酚、白鲜碱、鞣酮及甘草次酸等主要有效成分在小鼠皮肤中滞留量与时间的关系, 研究良肤乳膏小鼠皮肤药物动力学特征。方法: 采用 HPLC 测定皮肤生物样品中各成分的浓度, 计算不同时间给药, 皮肤中丹皮酚、白鲜碱、鞣酮、甘草次酸的滞留量, 采用 DAS 软件拟合药物动力学参数。结果: 良肤乳膏中丹皮酚、甘草次酸在小鼠皮肤中滞留量的动力学过程符合二室模型, 白鲜碱、鞣酮符合一室模型, 4 种成分皮肤给药 $t_{1/2\alpha}$ 分别为 0.307, 0.112, 0.146, 0.216 h, T_{lag} 分别为 0.006, 0.123, 0.136, 0.109 h, T_{max} 均 0.5 h, C_{max} 分别为 40.163, 1.607, 6.725, 100.553 $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$, $t_{1/2\beta}$ 分别为 14.719, 1.262, 0.838, 234.807 h, $AUC_{0-\infty}$ 分别为 116.987, 2.713, 9.345, 697.000 $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$, $MRT_{0-\infty}$ 分别为 3.662, 1.67, 1.585, 10.897。结论: 4 种主要有效成分能迅速渗透进入皮肤, 并在皮肤局部较长时间蓄积, 有利于药物在皮肤局部长时间发挥药理作用。

[关键词] 良肤乳膏; 皮肤药物动力学; 丹皮酚; 白鲜碱; 鞣酮; 甘草次酸

良肤乳膏由牡丹皮、白鲜皮、甘草等组成, 具有清热凉血, 除湿解毒, 祛风止痒功效, 具有抗真菌、抗炎、抗过敏等药理作用, 局部应用可治疗多种原因引起的皮肤瘙痒^[1]。瘙痒是皮肤病最为常见的症状之一, 可局限于身体某一部位, 也可泛发全身, 局部治疗药物应能够有效的透过皮肤, 并可能多的滞留在皮肤^[2]。故本实验采用良肤乳膏小鼠皮肤给药, 测定不同时间点中丹皮酚 (paeonol, Pae)、白鲜碱 (dictamnine, Dic)、鞣酮 (fraxinellone, Fra)、甘草次酸 (glycyrrhetic acid, Gly) 的单位体积皮肤滞留量, 来考察皮肤局部药物动力学, 并用 DAS 软件拟合药物动力学参数, 探讨其皮肤药动学规律, 为良肤外用制剂的临床合理运用及质量评价提供实验依据。

1 材料

Agilent 1200 高效液相色谱仪 (美国安捷伦科技有限公司), BS124S 型 Sartorius 电子天平 (北京赛多利斯科学仪器有限公司), GL-16 型离心机 (上海安亭科学仪器厂), SZ-93 型自动双重纯水蒸馏器 (上海亚荣生化仪器厂); 丹皮酚、白鲜碱、鞣酮、甘草次

酸对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号分别为 110708-200505, 111654-200301, 111700-200501, 110723-200411); 良肤凝胶型乳膏 (自制); 甲醇、乙腈为色谱纯, 水为双蒸水, 其余试剂均为分析纯。

昆明种小鼠, 雄性, 体重 (20 ± 5) g, 购自江西中医学院动物实验中心, 合格证号 JZDW 2008-0240。

2 方法与结果

2.1 皮肤样品的制备与处理

健康小鼠 36 只, 雄性, 体重 18 ~ 22 g, 分别于实验室饲养 3 d 以适应本实验室环境, 试验前 1 d 小心剪去背部皮肤毛 (3 cm × 3 cm), 注意不要损伤皮肤, 禁食一夜, 自由饮水。实验时, 其中 6 只小鼠不给药, 其余按一定剂量 (0.3 g) 经皮给药, 将良肤凝胶型乳膏用棉签均匀涂布于背部脱毛处, 于给药后 10, 20, 30 min, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 h 分别处死 3 只, 用生理盐水反复擦拭给药皮肤表面, 剥离皮肤, 去除附着的肌肉。将各时间点的小鼠皮肤样品剪成碎屑, 放置玻璃试管中, 加入 5 mL 甲醇超声提取 2 次, 每次 30 min, 5 000 r · min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液, 加置 10 mL 量瓶中, 定容, 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 作为供试品溶液。

2.2 皮肤样品 HPLC 分析方法的建立

2.2.1 对照品贮备溶液的制备 分别精密称取 Pae, Dic, Fra, Gly 对照品适量, 置 50 mL 量瓶中, 加甲醇溶解, 稀释至刻度, 摇匀, 即得, 质量浓度分别为

[稿件编号] 20100108003

[基金项目] 国家“十一五”科技支撑计划项目 (2008BA153B07)

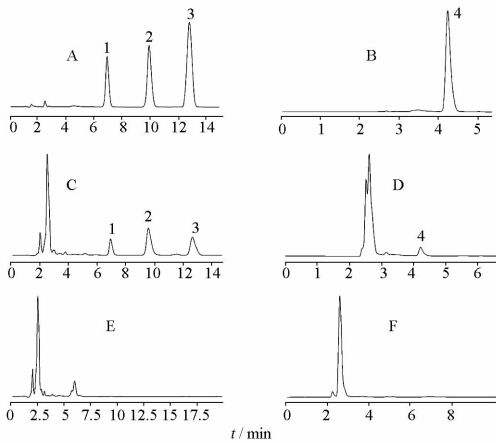
[通信作者] * 朱卫丰, Tel: (0791) 7119010, E-mail: zwflady@tom.com



104.8, 109.6, 95.96.4 mg · L⁻¹。

2.2.2 色谱条件 依利特 Hypersil ODS C₁₈ 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), Pae, Dic, Fra 流动相甲醇-水(57:43), 检测波长 237 nm, Gly 流动相甲醇-水-磷酸(93:7:0.2), 检测波长 250 nm, 流速 1.0 mL · min⁻¹, 柱温 40 °C, 进样 20 μL。

2.2.3 专属性考察 未给药小鼠皮肤以及给药小鼠皮肤经处理后, 进样分析, 见图 1。结果表明, 未给药的空白皮肤样品不干扰良肤 4 种有效成分的 HPLC 测定。



A, B. 对照品; C, D. 皮肤样品; E(测 Pae, Dic, Fra), F(测 Gly), 皮肤空白样品; 1. Pae; 2. Dic; 3. Fra; 4. Gly。

图 1 良肤有效成分在小鼠皮肤中的 HPLC 图

2.2.4 线性范围考察 精密量取各有效成分对照品贮备液适量, 配置成一系列浓度 *C* 的对照品溶液, 按 2.2.2 项中的色谱条件进样分析, 将各对照品溶液的浓度 *C* 与峰面积 *A* 进行回归, 见表 1。

表 1 线性范围

成分	线性方程	<i>r</i>	线性范围/mg · L ⁻¹
Pae	$A = 38.0885C - 2.5160$	0.9997	0.2620 ~ 10.4800
Dic	$A = 292.3680C - 1.0290$	0.9995	0.02192 ~ 2.1920
Fra	$A = 47.4671C + 0.0182$	0.9998	0.09500 ~ 0.9500
Gly	$A = 28.5784C - 1.4485$	0.9999	0.1928 ~ 19.2800

2.2.5 方法回收率试验 分别加 Pae 对照品贮备液 500, 250, 100 μL, Dic 对照品贮备液 100, 50, 20 μL, Fra 及 Gly 对照品贮备液 1 000, 500, 200 μL 至装有空白皮肤样品的玻璃试管中, 加甲醇适量, 按

2.2 生物样品制备方法制备成高、中、低浓度的供试品溶液, 进样分析, 求出各供试品溶液的浓度, 将测得浓度与已知浓度相比, 计算加样回收率, 见表 2。

表 2 加样回收率($\bar{x} \pm s, n=3$)

成分	加入质量浓度	测得质量浓度	回收率	RSD
	/mg · L ⁻¹	/mg · L ⁻¹	/%	/%
Pae	5.24	5.79 ± 0.05	110.53 ± 1.04	0.9
	2.62	2.81 ± 0.07	107.30 ± 2.73	2.6
	1.048	1.15 ± 0.03	109.33 ± 2.88	2.6
Dic	1.096	1.19 ± 0.06	108.58 ± 5.70	5.3
	0.548	0.55 ± 0.04	100.16 ± 6.49	6.5
	0.219	0.24 ± 0.01	107.59 ± 4.88	4.5
Fra	9.50	8.68 ± 0.08	91.32 ± 0.82	0.9
	4.75	4.33 ± 0.08	91.06 ± 1.67	1.8
	1.90	1.81 ± 0.05	95.39 ± 2.61	2.7
Gly	9.64	10.08 ± 0.08	104.54 ± 0.79	0.8
	4.82	4.94 ± 0.11	102.58 ± 2.28	2.2
	1.928	2.01 ± 0.04	105.31 ± 3.55	3.4

2.2.6 精密度试验 将 2.2.5 项中高、中、低 3 个浓度的样品同法日内各测定 3 次, 并连续测定 3 d, 计算日内、日间精密度, 见表 3。

表 3 精密度试验($\bar{x} \pm s, n=3$)

成分	日内精密度		日间精密度	
	质量浓度/mg · L ⁻¹	RSD/%	质量浓度/mg · L ⁻¹	RSD/%
Pae	5.36 ± 0.09	1.72	5.47 ± 0.16	2.86
	2.60 ± 0.05	1.81	2.84 ± 0.08	2.72
	1.00 ± 0.04	3.95	1.08 ± 0.05	4.18
Dic	1.19 ± 0.02	1.28	1.15 ± 0.05	4.03
	0.52 ± 0.01	2.48	0.51 ± 0.01	2.29
	0.22 ± 0.01	3.81	0.22 ± 0.01	6.30
Fra	9.03 ± 0.13	1.47	9.17 ± 0.22	2.41
	4.68 ± 0.16	3.42	4.53 ± 0.17	3.75
	1.88 ± 0.10	5.26	1.91 ± 0.11	5.99
Gly	9.56 ± 0.26	2.74	9.42 ± 0.34	3.58
	4.79 ± 0.12	2.61	4.79 ± 0.18	3.83
	1.96 ± 0.06	3.12	1.96 ± 0.11	5.88

2.3 皮肤样品 HPLC 测定

采用 2.2 建立的 HPLC 方法, 测定良肤乳膏小鼠皮肤给药后不同时间点的皮肤样品, 计算皮肤样品中 Pae, Dic, Fra 及 Gly 的浓度, 并按小鼠背部全皮肤厚度为(0.84 ± 0.02) mm^[3] 计算不同时间的单位体积小鼠皮肤中的滞留量, 见表 4, 滞留量-时间曲线见图 3。



表 4 小鼠给药后不同时间皮肤中有效成分的滞留量($\bar{x} \pm s, n=3$)

成分	10 min	20 min	30 min	1 h	2 h	4 h	6 h	8 h	10 h	12 h	24 h
Pae	15.91 ± 6.74	16.42 ± 3.93	40.16 ± 8.25	21.40 ± 5.20	7.65 ± 2.67	5.45 ± 0.74	3.55 ± 1.46	3.72 ± 0.89	3.59 ± 0.49	2.92 ± 0.34	-
Dic	0.40 ± 0.12	0.70 ± 0.07	1.61 ± 0.11	0.78 ± 0.22	0.44 ± 0.13	0.45 ± 0.08	-	-	-	-	-
Fra	1.29 ± 0.53	2.54 ± 0.37	6.72 ± 0.10	3.37 ± 0.92	1.59 ± 0.63	1.56 ± 0.56	-	-	-	-	-
Gly	32.05 ± 8.38	32.19 ± 8.07	100.55 ± 42.41	39.27 ± 11.34	18.52 ± 3.39	35.80 ± 15.41	11.21 ± 2.97	22.24 ± 1.69	19.76 ± 2.85	16.62 ± 1.67	19.68 ± 9.81

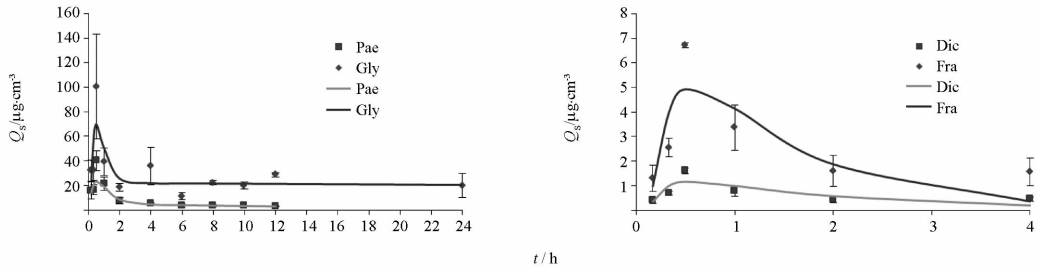


图 3 小鼠给药后不同时间皮肤中有效成分的滞留量-时间曲线图

2.4 药动学参数拟合

将小鼠给药后不同时间的单位体积皮肤中有效

成分的滞留量数据用 DAS 药动学软件处理各成分主要药动学参数,见表 5。

表 5 良肤乳膏小鼠皮肤给药后各有效成分滞留量动力学房室模型参数

成分	$t_{1/2\alpha}$ /h	$t_{1/2\beta}$ /h	AUC_{0-t} / $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$	$AUC_{0-\infty}$ / $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$	$t_{1/2K_a}$ /h	T_{lag} /h	MRT_{0-t} /h	$MRT_{0-\infty}$ /h	T_{max} /h	C_{max} / $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$
Pae	0.372	14.719	75.821	116.987	0.307	0.006	3.662	10.665	0.5	40.163
Dic	-	1.262	2.445	2.713	0.112	0.123	1.67	1.808	0.5	1.607
Fra	-	0.838	8.852	9.345	0.146	0.136	1.585	1.678	0.5	6.725
Gly	0.270	234.807	561.548	697.000	0.216	0.109	10.897	23.797	0.5	100.553

注: Pae, Gly 符合二室模型; Dic, Fra 符合一室模型。

3 结论与讨论

中药外用复方制剂在进行透皮吸收研究时,测定指标往往不易选择,这与中药多成分的复杂性、有效成分不明确、常因含量低透过量少而不易测出等有关。牡丹皮、白鲜皮、甘草为良肤乳膏处方的主要药物,其中所含主要有效成分 Pae, Dic, Fra, Gly 药理作用明显,且与处方功能主治相符,易于测定。

良肤乳膏中 Pae, Gly 在皮肤中滞留量的动力学过程符合二室模型, Dic, Fra 符合一室模型。Pae, Dic, Fra, Gly 时滞 (T_{lag}) 和吸收半衰期 ($T_{1/2K_a}$) 均较短,皮肤滞留量能在短时间 (T_{max} 为 0.5 h) 达到峰值,表明能迅速渗透进入皮肤并达到最大滞留量,这与良肤乳膏能短时间渗透进入皮肤止痒相符。Pae, Gly 的

消除半衰期 ($t_{1/2\beta}$)、驻留时间 (MRT) 均较长,表明在皮肤局部长时间保持较高的浓度,有利于药物在皮肤表皮和真皮局部长时间发挥止痒作用。为了解良肤乳膏的主要有效成分经皮渗透后进一步吸收入血液循环后在体内的情况,应进一步开展皮肤药物动力学和血液药物动力学之间相关性研究。

[参考文献]

- [1] 王森,朱卫丰,欧水平,等. 促透剂对良肤乳膏中丹皮酚、白鲜碱、柠檬和甘草次酸的体外透皮吸收及皮肤滞留量的影响[J]. 中国中药杂志,2009,34(14):14.
- [2] 杨慧敏,徐佳,杨岚,等. 皮肤瘙痒的发生机理与中医辨证施治相关性探讨[J]. 中国中西医结合皮肤性病学杂志,2006,5(3):175.
- [3] 郑俊民. 经皮给药新剂型[M]. 北京:人民卫生出版社,2006:31.



Dermatopharmacokinetic studies of Liangfu cream in rat skin

WANG Sen¹, OU Shuiping^{1,2}, GUAN Yongmei¹, WU Dezhi¹, CHEN Lihua¹, ZHU Weifeng^{1*}

(1. *Key Laboratory of Modern Preparation of Traditional Chinese Medicine of Ministry of Education, Nanchang 330004, China;*
2. *Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China*)

[**Abstract**] **Objective:** To study the relationship between deposition content and time of the active ingredients in rat skin, and investigate the dermatopharmacokinetics of Liangfu Cream. **Method:** The contents of paeonol, dictamnine, fraxinellone and glycyrrhetic acid in rat skin were determined by HPLC. The dermatopharmacokinetics parameters were calculated by DAS software. **Result:** The dermatopharmacokinetics of paeonol and glycyrrhetic acid were two compartment model, while that of dictamnine and fraxinellone were one compartment model; $T_{1/2\alpha}$ of four active ingredients were 0.307, 0.112, 0.146, 0.216 h, respectively; T_{lag} of them were 0.006, 0.123, 0.136, 0.109 h, respectively; all the T_{max} of them was 0.5 h; the C_{max} were 40.163, 1.607, 6.725, 100.553 $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$, respectively; the $t_{1/2\beta}$ were 14.719, 1.262, 0.838, 234.807 h, respectively; the $\text{AUC}_{0-\infty}$ were 16.987, 2.713, 9.345, 697.000 $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$, respectively; and the $\text{MRT}_{0-\infty}$ were 3.662, 1.67, 1.585, 10.897, respectively. **Conclusion:** The skin pharmacokinetics characteristic of four ingredients in Liangfu cream is lined with the cataplasm long time.

[**Key words**] Liangfu cream; dermatopharmacokinetic; paeonol; dictamnine; fraxinellone; glycyrrhetic acid

doi: 10.4268/cjcm20101707

[责任编辑 周驰]

本刊重要启事

本刊已开通在线支付功能,作者请登录本刊网站 www.cjcm.com.cn“作者中心”,点击在线充值,可以选择网上银行(没开通网银功能的帐户可以选择信用卡充值)和手机充值卡 2 种充值方式,充值成功后系统会显示您的账号余额。然后您可以根据稿件状态和编辑部邮件通知来缴纳相应的费用,如审稿费,发表费等。如有疑问请咨询周驰编辑:13810178861,21310385@qq.com。