正乳贴凝胶贴膏体外透皮特性与皮肤安全性评价研究

张宇[1]，王峰[2]，余志芳[2]，马瑞瑞[2]，孙悦[1]，包旭宏[2,3*]，张樱山[2,3](1.甘肃中医药大学药学院，兰州 730030；2.甘肃省中药现代制药工程研究院有限公司，兰州 730030；3.甘肃奇正藏药有限公司，兰州 730030)

摘要：目的 研究藏药新药正乳贴凝胶贴膏(以下简称“正乳贴”)的体外透皮特性，并采用不同种属动物(豚鼠、新西兰兔)实验对其皮肤用药安全性进行评价。**方法** 采用立式 Franz 扩散池法进行体外透皮试验，以巴马香幼猪皮肤作为透过屏障，分别采用 HPLC 和 GC 测定接收介质中山栀苷甲酯+8-*O*-乙酰山栀苷甲酯、冰片和樟脑的浓度，计算累积透过量及透过率，考察正乳贴的体外透皮特性；采用 Buehler 试验，研究正乳贴敷于豚鼠皮肤后的致敏情况，并观察正乳贴单次或多次给药敷于新西兰兔完整及破损皮肤处后皮肤的刺激情况。**结果** 正乳贴在 24 h 内山栀苷甲酯+8-*O*-乙酰山栀苷甲酯、冰片和樟脑的累积透过量分别为 14.14，348.21，490.97 μg·cm^{-2}，累积透过率分别为 6.2%，10.2%，15.3%，平均透过速率分别为 0.59，14.51，20.46 μg·cm^{-2}·h^{-1}。正乳贴对豚鼠皮肤未发现致敏反应，对新西兰兔完整皮肤无刺激性，对破损皮肤有轻度刺激作用。**结论** 正乳贴体外透皮性能良好，各指标成分体外透皮过程均符合零级动力学方程；对豚鼠及新西兰兔皮肤无刺激及致敏作用，皮肤外用安全可靠，具备良好的临床应用价值。

关键词：正乳贴凝胶贴膏；体外透皮特性；指标成分；累积透过率；经皮水分流失；皮肤安全性

中图分类号：R965.3　　**文献标志码：**B　　**文章编号：**1007-7693(2023)23-3267-08

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20223524

引用本文：张宇，王峰，余志芳，等. 正乳贴凝胶贴膏体外透皮特性与皮肤安全性评价研究[J]. 中国现代应用药学，2023，40(23)：3267-3274.

Study on *in Vitro* Transdermal Properties and Skin Safety Evaluation of Zhengrutie Cataplasm

ZHANG Yu[1], WANG Feng[2], YU Zhifang[2], MA Ruirui[2], SUN Yue[1], BAO Xuhong[2,3*], ZHANG Yingshan[2,3] (*1.College of Pharmacy, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730030, China; 2.Gansu Pharmaceutical Engineering Research Institute of Traditional Chinese Medicine Co., Ltd., Lanzhou 730030, China; 3.Gansu Qizheng Tibetan Medicine Co., Ltd., Lanzhou 730030, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the *in vitro* transdermal characteristics of Tibetan new drugs hereinafter referred to as Zhengrutie cataplasm, and to evaluate the safety of skin medication by using different species of animals(guinea pigs, New Zealand rabbits). **METHODS** The improved vertical Franz diffusion cell method was used for *in vitro* transdermal testand the skin of Bama miniature pig was used as the permeation barrier. The cumulative permeation amount and rate of geniposide methyl ester and 8-*O*-acetyl geniposide methyl ester, borneol and camphor in the receiving medium were determined by HPLC and GC, respectively, to investigate the *in vitro* transdermal characteristics of Zhengrutie cataplasm. Buehler test was used to study the sensitization of Zhengrutie cataplasm on guinea pig skin. Observed the skin irritation after single or multiple application of Zhengrutie cataplasm on intact and damaged skin of New Zealand rabbits. **RESULTS** The cumulative permeation amount of the sum of geniposide methyl ester and 8-*O*-acetyl geniposide methyl ester, borneol and camphor within 24 h were 14.14, 348.21, 490.97 μg·cm^{-2}, respectively. The cumulative permeation amount were 6.2%, 10.2% and 15.3%, respectively. The average permeation amount were 0.59, 14.51 and 20.46 μg·cm^{-2}·h^{-1}. No allergic reaction to guinea pig skin, no irritation to intact skin of New Zealand rabbits, mild irritation to damaged skin. **CONCLUSION** The *in vitro* transdermal performance of Zhengrutie cataplasm is good. The *in vitro* transdermal process conforms to the zero-order kinetic equation. It has no irritation and sensitization effect on the skin of guinea pigs and New Zealand rabbits. It is safe and reliable for skin external use and has good clinical application value.

KEYWORDS: Zhengrutie cataplasm; *in vitro* skin permeation features; index component; cumulative penetration rate; trans epidermal water loss; skin safety

中药凝胶贴膏系指中药原料药物与适宜的亲水性基质混匀后涂布于背衬材料上制成的贴膏剂[1]；具有载药量大，血药浓度稳定，皮肤相容性好，不污染衣物，使用安全方便，患者顺应性高等特点，是近年国内经皮给药制剂发展领域的优势剂型[2]。乳腺增生病是乳腺组织既非炎症又非肿瘤的良性增生性疾病，是临床常见的女性疾病，高发于 25~45 岁的中青年妇女，且临床发病

作者简介：张宇，男，硕士生　E-mail: zy18893812058@163.com　**通信作者：**包旭宏，男，正高级工程师　E-mail: 276693312@qq.com

率逐年升高、年龄也越发年轻化，目前以西医治疗较多，但不良反应大，临床受限颇多[3]。因此，本研究拟采用中药凝胶贴膏外贴局部给药的方式来治疗乳腺增生疾病。

正乳贴凝胶贴膏(Zhengrutie cataplasm)是依据传统藏药外治理论，在藏药经验方五味麻花艽丸基础上对原方进行药味加减改良研制而成，克服了丸剂品种剂量大，服用不便，生产操作不当易致溶散，崩解迟缓等剂型缺陷。处方由独一味、秦艽花、冰片、樟脑等 7 味药组成，用于治疗乳房结节肿胀、疼痛等，具有活血止痛、消肿散结的作用[4]。本研究选择处方药味独一味中的有效成分山栀苷甲酯和 8-*O*-乙酰山栀苷甲酯及冰片、樟脑作为指标成分，考察正乳贴的体外透皮特性；并进行了正乳贴对豚鼠皮肤的致敏性试验和对新西兰兔皮肤的刺激性试验，以初步评价其皮肤外用的安全性。

1 材料

1.1 仪器

Microette Plus 型全自动药物透皮扩散试验仪(美国汉森科技有限公司)；CHY-C2A 测厚仪(济南兰光机电技术有限公司)；MPA10 多探头皮肤测试仪(北京金宏帆商贸有限公司)；Agilent 8860 气相色谱仪、Agilent 1260 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司)；液相色谱柱：SunFire C_{18}(250 mm×4.6 mm，5 μm)、SB-Aq C_{18}(250 mm×4.6 mm，5 μm)；气相色谱柱：HP INNOMAX(0.32 mm×30 m，0.25 μm)；XS205DU 电子天平、XPR10 电子天平均购自梅特勒-托利多仪器有限公司；ES3200 型电子天平(天津市德安特传感器技术有限公司)；基因型 1820D 立式超纯水机(上海摩勒科学仪器有限公司)。

1.2 材料与试剂

巴马香幼猪皮肤(临西县敬德农产品销售有限公司)；磷酸盐缓冲液(pH 7.2)(青岛日水生物科技有限公司，批号：20200602)；樟脑(批号：110747-202011；纯度：98.8%)、冰片(批号：110743-201706；纯度：97.6%)、山栀苷甲酯(批号：111873-202004；纯度：96.6%)、8-*O*-乙酰山栀苷甲酯(批号：111872-201703；纯度：90.3%)均购自中国食品药品检定研究院；乙腈、乙酸、磷酸为色谱纯，乙醇、乙酸乙酯、正己烷、甲醇、盐酸均为分析纯；硫化钡(国药集团化学试剂有限公司，批号：F20210114)；2,4-二硝基氯代苯(北京市东环联合化工厂，批号：951104)。水为屈臣氏纯净水。正乳贴[批号：2111020，自制，其中樟脑含量 331 mg·(100 cm)$^{-2}$、冰片含量 341 mg·(100 cm)$^{-2}$、山栀苷甲酯与 8-*O*-乙酰山栀苷甲酯总含量为 22.8 mg·(100 cm)$^{-2}$]。

1.3 动物

皮肤致敏性试验使用 Hartley 豚鼠，♀，30 只，6~8 周龄，动物来源：中国农业科学院兰州兽医研究所，动物生产许可证号：SCXK(甘)2020-0002；皮肤刺激性试验用新西兰家兔，♀，16 只，2.0~2.5 kg，动物来源：中国农业科学院兰州兽医研究所，动物生产许可证号：SCXK(甘)2020-0002。本研究所涉及动物实验符合世界卫生组织《涉及人的生物医学研究国际伦理准则》和世界医学协会最新修订的《世界医学协会赫尔辛基宣言》的相关规定。

2 方法与结果

2.1 接收液中指标成分的分析方法

2.1.1 山栀苷甲酯+8-*O*-乙酰山栀苷甲酯的分析方法

2.1.1.1 对照品溶液的制备 取山栀苷甲酯对照品适量，精密称定，加 30%甲醇制成每 1 mL 含山栀苷甲酯 2 μg 的溶液；取 8-*O*-乙酰山栀苷甲酯对照品适量，精密称定，加 30%甲醇制成每 1 mL 含 8-*O*-乙酰山栀苷甲酯 3 μg 的对照品溶液，摇匀，即得。

2.1.1.2 供试品溶液的制备 取正乳贴体外透皮接收液适量，0.22 μm 微孔滤膜滤过，取续滤液，即得。

2.1.1.3 色谱条件 以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂；以乙腈-甲醇(20∶7)为流动相 A，0.2%磷酸为流动相 B，进行梯度洗脱(0~28 min，9%A；28~42 min，9%→18%A；42~60 min，18%→20%A；60~65 min，20%→90%A；65~70 min，90%A；70~75 min，90%→9%A；75~85 min，9%A)，流速 1.0 mL·min^{-1}，检测波长为 235 nm，柱温：40 ℃。理论板数按山栀苷甲酯峰计算应≥5 000。

分别精密吸取对照品溶液和供试品溶液各 20 μL，注入液相色谱仪，测定。

2.1.1.4 专属性考察 精密称取适量山栀苷甲酯配成 5 μg·mL^{-1} 的对照品溶液，精密称取 8-*O*-乙酰山栀苷甲酯配成 5 μg·mL^{-1} 的对照品溶液，再精密

吸取未加药物贴剂的空白皮肤透过液作为空白溶液，分别注入液相色谱仪进行测定，结果显示山栀苷甲酯和 8-*O*-乙酰山栀苷甲酯均与其他色谱峰分离良好，分离度>1.5，见图 1。

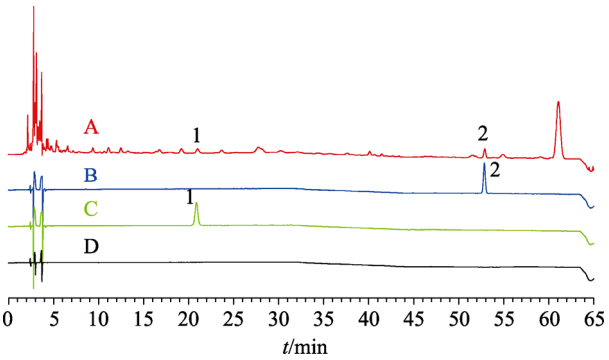

图 1 正乳贴凝胶贴膏中山栀苷甲酯和 8-*O*-乙酰山栀苷甲酯的 HPLC 图谱

A–供试品溶液；B–8-*O*-乙酰山栀苷甲酯对照品溶液；C–山栀苷甲酯对照品溶液；D–空白溶液；1–山栀苷甲酯；2–8-*O*-乙酰山栀苷甲酯。

Fig. 1 HPLC chromatograms of geniposide methyl ester and 8-*O*-acetyl geniposide methyl ester in Zhengrutie cataplasm

A–test solution; B–8-*O*-acetyl geniside methyl ester reference solution; C–geniside methyl ester reference solution; D–blank solution; 1–geniside methyl ester; 2–8-*O*-acetyl geniside methyl ester.

2.1.1.5 线性关系考察 取山栀苷甲酯与 8-*O*-乙酰山栀苷甲酯的对照品适量，精密称定，加 30%甲醇制成山栀苷甲酯为 9.589 μg·mL^{-1}、8-*O*-乙酰山栀苷甲酯为 9.189 μg·mL^{-1} 的混合对照品母液，逐级稀释得山栀苷甲酯 0.299，0.599，1.199，2.399，4.799，9.589 μg·mL^{-1}，8-*O*-乙酰山栀苷甲酯 0.287，0.574，1.149，2.297，4.594，9.189 μg·mL^{-1} 的混合对照品溶液；按“2.1.1.3”项下色谱条件进行测定，分别以山栀苷甲酯和 8-*O*-乙酰山栀苷甲酯浓度为横坐标(X)，相应峰面积为纵坐标(Y)，进行线性回归，得线性回归方程分别为 Y=29 934.98X−1 355.61 (r=0.999 9)，Y=27 536.77X−1 167.42(r=0.999 9)，表明各成分在 0.006 0~0.191 8 μg，0.005 7~0.183 8 μg 线性关系良好。

2.1.1.6 仪器精密度试验 取“2.1.1.1”项下的对照品溶液，连续进样 6 次，按“2.1.1.3”项下色谱条件进行测定，计算得山栀苷甲酯与 8-*O*-乙酰山栀苷甲酯峰面积的相对标准偏差(RSD)分别为 0.88%，0.38%，表明仪器精密度良好。

2.1.1.7 稳定性试验 取“2.1.1.2”项下供试品溶液，室温条件下于 0，4，8，12，16，24 h 按“2.1.1.3”项下色谱条件进行测定，计算得山栀苷甲酯与 8-*O*-乙酰山栀苷甲酯峰面积的 RSD 分别为 1.72%，1.77%，表明供试品样品在 24 h 内稳定性良好。

2.1.1.8 回收率试验 精密称取山栀苷甲酯与 8-*O*-乙酰山栀苷甲酯对照品适量，加空白透皮接收液，分别制成含山栀苷甲酯 1.5，3.0，4.5 μg·mL^{-1}，含 8-*O*-乙酰山栀苷甲酯 2.0，4.0，6.0 μg·mL^{-1} 的溶液各 3 份，测定其浓度，结果山栀苷甲酯与 8-*O*-乙酰山栀苷甲酯的平均回收率为 97.4%，101.3%，RSD 分别为 0.91%，0.51%，表明该方法准确度良好。

2.1.2 冰片、樟脑的分析方法

2.1.2.1 对照品溶液的制备 精密称取樟脑对照品适量，加乙酸乙酯制成每 1 mL 含樟脑 50 μg 的对照品溶液；精密称取冰片对照品适量，加乙酸乙酯制成每 1 mL 含冰片 50 μg 的对照品溶液。

2.1.2.2 供试品溶液的制备 取正乳贴凝胶贴膏接收液 1.5 mL，置 5 mL 离心管中，加 1.5 mL 乙酸乙酯，充分振摇，待分层后，取乙酸乙酯层，0.22 μm 微孔滤膜滤过，取续滤液，即得。

2.1.2.3 色谱条件 以聚乙二醇 20000(PEG-20M)为固定相的毛细管柱(30 m×0.32 mm，0.25 μm)，程序升温，起始温度为 70 ℃，以 10 ℃·min^{-1} 的速率升温至 180 ℃，保持 2 min；进样口温度 200 ℃；检测器温度 250 ℃。

分别吸取对照品溶液与供试品溶液各 1 μL，注入气相色谱仪，测定。

2.1.2.4 专属性考察 精密吸取未加药物贴剂的空白皮肤透过液 1.5 mL，置 5 mL 离心管中，加 1.5 mL 乙酸乙酯，充分振摇，待分层后，取乙酸乙酯层，滤过，取续滤液，作为空白溶液。将樟脑对照品溶液、冰片对照品溶液和空白溶液分别注入气相色谱仪进行测定，冰片和樟脑均与其他色谱峰分离良好，分离度>1.5，见图 2。

2.1.2.5 线性关系考察 取冰片、樟脑适量，精密称定，加乙酸乙酯制成冰片浓度为 179.19 μg·mL^{-1}、樟脑浓度为 152.66 μg·mL^{-1} 的混合对照品母液，逐级稀释得冰片浓度为 179.19，89.597，44.798，22.399，11.200，5.600 μg·mL^{-1} 的对照品溶液和樟脑浓度为 152.66，76.333，38.166，19.083，9.542，4.771 μg·mL^{-1} 的对照品溶液。按“2.1.2.3”项下色谱条件进行测定，以各对照品浓度为横坐标(X)，各峰面积为纵坐标(Y)，分别进行线性回归，得冰片、樟脑线性回归方程分别为 Y=16.974 9X−5.422 9 (r=0.999 9)，Y=16.908 0X−3.636 8(r=0.999 9)，结果表明各成分在 0.005 6~0.179 2 μg，0.004 8~

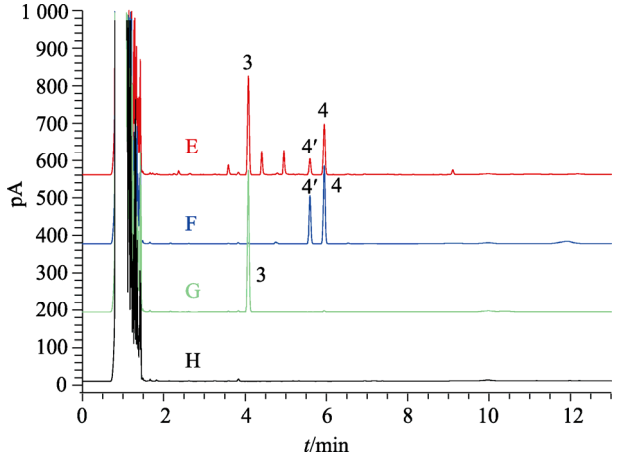

图 2 GC 测定正乳贴凝胶贴膏中冰片和樟脑含量

E–供试品溶液；F–冰片对照品溶液；G–樟脑对照品溶液；H–空白溶液；3–樟脑；4、4’–冰片。

Fig. 2 Content determination of borneol and camphor in Zhengrutie cataplasm by GC

E–test solution; F–borneol reference solution; G–camphor reference solution; H–blank solution; 3–camphor; 4, 4’–borneol.

0.152 7 μg 内线性关系良好。

2.1.2.6 仪器精密度试验 将“2.1.2.1”项下配制的冰片与樟脑对照品溶液连续进样 6 次，按“2.1.2.3”项下色谱条件进行测定，计算冰片与樟脑峰面积的 RSD 分别为 0.73%，0.70%，结果表明仪器精密度良好。

2.1.2.7 稳定性试验 取“2.1.2.2”项下供试品溶液，室温条件下于 0，4，8，12，16，24 h 按“2.1.2.3”项下色谱条件进行测定，计算冰片与樟脑峰面积的 RSD 分别为 1.29%，1.08%，表明供试品样品在 24 h 内稳定性良好。

2.1.2.8 回收率试验 精密称取冰片与樟脑对照品适量，加空白透皮接收液，分别制成含冰片 21.692，43.385，63.801 μg·L^{-1}，含樟脑 23.964，47.929，70.484 μg·mL^{-1} 的溶液各 3 份，按“2.1.2.2”项下方法制备供试品溶液，即取上述溶液 1.5 mL，置 5 mL 离心管中，加 1.5 mL 乙酸乙酯，充分振摇，待分层后，取乙酸乙酯层，滤过，取续滤液，即得。按“2.1.2.3”项下色谱条件进行测定，结果冰片与樟脑的平均回收率为 99.1%，101.2%，RSD 分别为 1.30%，1.20%，表明该方法准确度良好。

2.2 体外透皮试验[5]

2.2.1 离体皮肤选择 本研究选用 1 月龄的雌性巴马香幼猪腹部皮肤，将剥离好的皮肤用保鲜膜包裹好置于保鲜盒中，于–22 ℃下冰箱冷冻保存。实验前 1 h 取出，室温解冻，使用前用生理盐水反复淋洗，用滤纸吸干皮肤表面的水分，备用[6-9]。

2.2.2 离体皮肤厚度及完整性测试 相关研究表明[10]，皮肤的厚度可能会影响体外经皮渗透的结果。美国食品药品监督管理局(FDA)提出皮肤的厚度应该控制在(500±250)μm，较厚的皮肤[(500~1 000)μm]会阻碍药物向接收介质中扩散[7,11]。本实验测定室温解冻后巴马香幼猪的皮肤厚度，见表 1，结果各个接收池平行测量 5 次的平均值依次为(525.2±4.1)，(524.8± 4.5)，(527.3±4.6)，(516.9±4.5)，(522.4±4.4)μm，符合 FDA 皮肤厚度要求。此外，皮肤屏障的完整性对体外透皮试验极为重要，皮肤的前期处理和贮存条件等因素均会直接影响皮肤的完整性。本研究以经皮水分流失(trans epidermal water loss，TEWL)值作为评价指标，评估巴马香幼猪皮肤屏障的完整性，TEWL 值在 1~10 g·m^{-2}·h^{-1}，则认为皮肤的完整性较好[12]。试验前先测定本次试验用整体皮肤的 TEWL 值，并分别测定各个平行接收池对应皮肤的 TEWL 值，以曲线上光标的位置所对应的值(标准偏差最小)代表真实的 TEWL 值，结果各个接收池皮肤所对应的经皮水分流失 TEWL 值分别为 9.7，9.9，10.0，9.8，9.6 g·m^{-2}·h^{-1}，均≤ 10 g·m^{-2}·h^{-1}，说明皮肤的完整性较好，适用于体外透皮试验，见图 3。

表 1 实验用巴马香幼猪皮肤的厚度

Tab. 1 Skin thickness of Bama miniature pig for experiment

接收池	测试次数	最大值/μm	最小值/μm	$\bar{x}\pm s$ /μm
#1	5	530.3	519.3	525.2±4.1
#2	5	535.4	514.6	524.8±4.5
#3	5	534.1	512.9	527.3±4.6
#4	5	529.2	507.3	516.9±4.5
#5	5	533.7	515.6	522.4±4.4

2.2.3 接收介质的选择 正乳贴中山栀苷甲酯、8-*O*-乙酰山栀苷甲酯为环烯醚萜类成分，内含酯键易溶于水；冰片、樟脑微溶于水，因此选择适宜的接收介质有利于指标成分透过皮肤及满足其在接收液中的漏槽条件。本研究考察了上述 4 种指标成分在纯化水、生理盐水、磷酸盐缓冲液(pH=7.2)3 种接收介质中的稳态渗透速率(J_{ss}，μg·cm^{-2}·h^{-1})和滞后时间(T_{lag}，h)，见表 2，磷酸盐缓冲液(pH=7.2)作为接收介质时，山栀苷甲酯和 8-*O*-乙酰山栀苷甲酯、冰片、樟脑的累积透过量和 J_{ss} 均高于纯化水和生理盐水，且 T_{lag} 均小于后 2 种接收介质，因此，综合考虑各成分的 J_{ss} 和 T_{lag}，

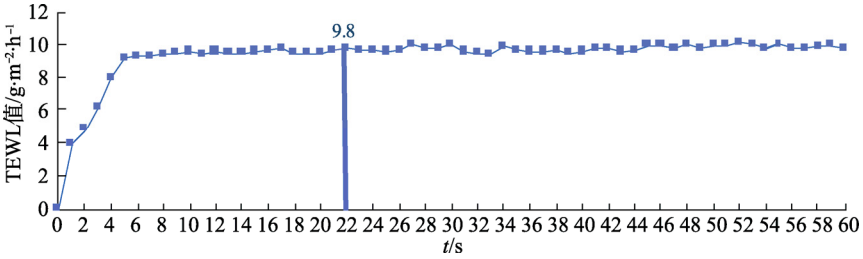

图 3 巴马香幼猪皮肤的经皮水分流失值

Fig. 3 Transdermal water loss value of Bama miniature pig skin

表 2 正乳贴凝胶贴膏在不同接收介质中 24 h 的累积经皮渗透零级动力学方程及参数

Tab. 2 Cumulative transdermal permeation kinetics equation and parameters within 24 h in different receiving solutions of Zhengrutie cataplasm

指标成分	接收液	累积透过量拟合方程	r 值	J_{ss}/μg·cm^{-2}·h^{-1}	T_{lag}/h	累积透过率/%
山栀苷甲酯+8-*O*-乙酰山栀苷甲酯	生理盐水	Q=0.619 91t–1.32 228	0.999 0	0.619 9	2.13	3.1
	纯化水	Q=0.549 22t–0.53 112	0.973 6	0.549 2	0.97	3.4
	磷酸盐缓冲液(pH=7.2)	Q=0.964 10t–0.48 515	0.978 8	0.964 1	0.50	5.6
冰片	生理盐水	Q=16.388 69t–34.79 687	0.995 5	16.388 7	2.12	5.6
	纯化水	Q=15.183 79t–37.20 959	0.988 6	15.183 8	2.45	6.1
	磷酸盐缓冲液(pH=7.2)	Q=17.523 06t+26.421 34	0.989 0	17.523 1	1.51	6.8
樟脑	生理盐水	Q=23.264 85t–37.506 64	0.995 9	23.264 8	1.61	8.8
	纯化水	Q=21.900 82t–43.525 97	0.989 6	21.900 8	1.99	9.3
	磷酸盐缓冲液(pH=7.2)	Q=25.509 96t–49.852 91	0.994 1	25.509 9	1.95	10.1

磷酸盐缓冲液(pH=7.2)作为接收介质时指标成分累积透过率高，数据稳定、渗透效果较好。

2.2.4 磁力搅拌速度的选择 根据正乳贴体外透皮预实验研究结果表明，当磁力搅拌速度为 400 r·min^{-1} 时，能够有效达到界面漏槽条件，且体外透皮过程平稳，指标成分经皮渗透性能较好。因此，本研究拟筛选磁力搅拌速度为 300，500 r·min^{-1} 时指标成分的累积透过情况，试验结果显示，500 r·min^{-1} 时，各成分累积透过量 $Q_{500\ r\cdot min^{-1}}$>$Q_{400\ r\cdot min^{-1}}$，渗透速率常数 $J_{ss500\ r\cdot min^{-1}}$>$J_{ss400\ r\cdot min^{-1}}$，且滞后时间 $T_{lag500\ r\cdot min^{-1}}$<$T_{lag400\ r\cdot min^{-1}}$，因此，直接考察 600 r·min^{-1} 时指标成分的累积透过情况。试验结果显示，冰片、樟脑的累积透过量 $Q_{600\ r\cdot min^{-1}}$>$Q_{500\ r\cdot min^{-1}}$，渗透速率常数 $J_{ss600\ r\cdot min^{-1}}$>$J_{ss500\ r\cdot min^{-1}}$，且滞后时间 $T_{lag600\ r\cdot min^{-1}}$< $T_{lag500\ r\cdot min^{-1}}$；山栀苷甲酯+8-*O*-乙酰山栀苷甲酯的累积透过量 $Q_{600\ r\cdot min^{-1}}$≈$Q_{500\ r\cdot min^{-1}}$，渗透速率常数 $J_{ss600\ r\cdot min^{-1}}$≈$J_{ss500\ r\cdot min^{-1}}$，且滞后时间 $T_{lag600\ r\cdot min^{-1}}$<$T_{lag500\ r\cdot min^{-1}}$，累积透过量越高，渗透速率常数越大，且滞后时间越小，说明有效成分的体外透皮性能越好，故选择 600 r·min^{-1} 作为本实验适宜的磁力搅拌速度。

2.2.5 经皮渗透试验 采用立式 Franz 扩散池，扩散池体积为 7 mL，有效扩散面积 1.766 cm^2，接收介质为磷酸盐缓冲液(pH=7.2)，使用前超声 10 min 排除气泡，磁力搅拌速度 600 r·min^{-1}，水浴控制恒温(32±0.5)℃，将“2.2.2”项下干净完整的巴马香猪皮肤固定于透皮扩散仪的供给池与接收池之间，使巴马香猪皮肤的角质层面向供给室，真皮层与接收液保持紧密接触，取正乳贴成品，将其精确裁至有效扩散面积的大小，除去盖衬层，紧密贴敷于扩散池内的巴马香猪皮肤表面(n=6)，分别于 2，4，8，12，18，24 h 取接收液 1.5 mL，同时补加等体积水浴恒温(32±0.5)℃的新鲜接收介质。将取得的接收液经“2.1.1.2”和“2.1.2.2”项下“供试品溶液的制备方法”处理，按照“2.1.1.3”“2.1.2.3”项下条件测定 4 种待测成分的含量，并绘制累积透过率曲线。结果显示，山栀苷甲酯+8-*O*-乙酰山栀苷甲酯、冰片和樟脑在 24 h 内累积透过量分别为 14.14，348.21，490.97 μg·cm^{-2}，累积透过率分别为 6.2%，10.2%，15.3%，平均透过速率分别为 0.59，14.51，20.46 μg·cm^{-2}·h^{-1}。对累积渗透率以不同方程模型进行拟合，山栀苷甲酯+8-*O*-乙酰山栀苷甲酯，冰片和樟脑的累积透过规律均符合零级动力学方程，稳态渗透速率(J_{ss})分别为 1.083 06，27.191 27，37.411 40 μg·cm^{-2}·h^{-1}。结果见表 3，图 4。

表 3 正乳贴凝胶贴膏中指标成分的体外透皮动力学方程

Tab. 3 *In vitro* transdermal kinetic equation of index components in Zhengrutie cataplasm

拟合方程	山栀苷甲酯+8-*O*-乙酰山栀苷甲酯	冰片	樟脑
零级方程	Q=1.083 06t−0.561 34(r=0.994 4)	Q=27.191 27t−40.796 04(r=0.999 2)	Q=37.411 40t−3.688 88(r=0.999 7)
一级方程	ln$Q$=0.001 75t+610.223 2(r=0.992 7)	ln$Q$ =0.019 37t−1049.038 13(r=0.994 4)	ln$Q$=0.011 92t−2 629.411 37(r=0.997 9)
Higuchi 方程	Q=6.887 94$t^{1/2}$−9.924 41(r=0.988 0)	Q=170.832 22$t^{1/2}$−269.279 59(r=0.962 9)	Q=235.325 92$t^{1/2}$−350.136 36(r=0.966 4)

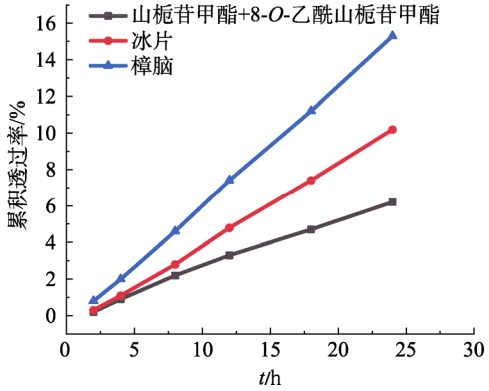

图 4 正乳贴凝胶贴膏中指标成分的累积透过曲线

Fig. 4 Cumulative permeation curve of index components in Zhengrutie cataplasm

2.3 皮肤致敏性试验[12-14]

2.3.1 致敏接触试验 选择 30 只 6~8 周龄的雌性健康豚鼠，随机分为 3 组，每组 10 只：对照组、正乳贴组和阳性对照组(1%的 2,4-二硝基氯代苯)，试验前 24 h 将其左侧背部脱毛，脱毛面积为 5 cm×6 cm。正乳贴组给予正乳贴凝胶贴膏每只 24 cm^2，对照组给予等面积凝胶贴膏空白基质，贴敷后随即用胶带环绕固定，防止被舔咬，阳性对照组给予 1% 2,4-二硝基氯代苯 0.2 mL，给药 6 h，去除药物。其后的第 7 天、第 14 天分别给予同样药物刺激。

2.3.2 激发接触试验 于末次刺激 14 d 后在动物右侧背部脱毛 5 cm×6 cm，次日豚鼠右侧脱毛区对照组给予凝胶贴膏空白基质、正乳贴组给予正乳贴凝胶贴膏每只 24 cm^2(即用胶带环绕固定，防止被舔咬)，阳性对照组用 0.1% 2,4-二硝基氯代苯激发，各组给药后固定 6 h，去除药物并观察皮肤反应情况。并再次记录 0，24，48，72 h 的皮肤反应情况。过敏反应平均分值=(红斑形成总分+水肿形成总分)/动物数，致敏发生率=(皮肤红斑、水肿或全身过敏反应的动物数)/受试动物总数×100%[15]。

2.3.3 皮肤致敏试验结果 试验结果表明，正乳贴组和对照组豚鼠皮肤均未出现任何红斑、红肿等过敏现象，致敏反应评分均为 0，致敏发生率均为 0%，而阳性对照药 2,4-二硝基氯代苯引发豚鼠皮肤出现典型的红斑、水肿等过敏反应表现，0~24 h 内致敏发生率为 100%。根据致敏性反应评分及皮肤致敏性评价标准，正乳贴多次给药无致敏性，试验结果见表 4。

表 4 正乳贴凝胶贴膏多次给药对豚鼠皮肤过敏试验结果(n=10)

Tab. 4 Results of guinea pig skin allergy test after repeated administration of Zhengrutie cataplasm(n=10)

组别	末次给药后时间/h	过敏反应平均分/分	致敏率/%	致敏反应强度
对照组	0	0	0	无致敏性
	24	0	0	无致敏性
	48	0	0	无致敏性
	72	0	0	无致敏性
正乳贴组	0	0	0	无致敏性
	24	0	0	无致敏性
	48	0	0	无致敏性
	72	0	0	无致敏性
阳性对照组	0	2.9	100	极强致敏
	24	1.8	100	极强敏性
	48	1.2	80	强致敏性
	72	0.4	40	中致敏性

2.4 皮肤刺激性试验[12,14-16]

2.4.1 单次给药对兔皮肤刺激试验

2.4.1.1 动物分组及给药方式 选取健康家兔 8 只，体质量 2.0~2.5 kg，雌性，先用剪刀剪去家兔背部脊柱左右两侧较长的毛，再涂上适量的硫化钡溶液褪去残留的毛发，脱毛面积左右两侧约 10 cm×15 cm，随机分为完整皮肤组和破损皮肤组，每组 4 只，试验采用同体自身对照。将家兔脱好毛的皮肤先用2%碘酒、再用75%乙醇消毒后，用 7 号针头在脱毛区将皮肤划破，以渗血为度，制成破损皮肤模型，分别进行给药。在完整皮肤和破损皮肤 2 组动物的左侧脱毛区贴敷正乳贴(面积 10 cm×10 cm，生药量 0.14 g·kg^{-1})，右侧贴敷凝胶贴膏空白基质，随即用胶带环绕固定，防止被舔咬并保持 24 h 后，除去固定胶布及正乳贴，用棉球蘸取生理盐水将保留的贴膏擦拭干净，并于 1，24，48，72 h 观察皮肤的刺激情况。刺激反应

平均分值=(红斑形成总分+水肿形成总分)/试验动物数，皮肤刺激强度分值在 0~0.49 为无刺激性，0.50~2.99 为轻度刺激性，3.00~5.99 为中度刺激性，6.00~8.00 为强刺激性。

2.4.1.2 单次给药皮肤刺激试验结果 试验结果显示，单次给药 24 h 后的 1，24，48，72 h 内，完整皮肤和破损皮肤均未出现红斑及水肿现象，且 48 h 后破损皮肤结痂明显，于 72 h 后逐渐脱落，对比空白基质组和正乳贴组皮肤的刺激情况，排除药物引起的损伤导致皮肤结痂，根据皮肤刺激评价标准，正乳贴单次给药对皮肤无刺激性，见表 5。

表 5 正乳贴凝胶贴膏单次给药对家兔皮肤刺激性试验结果(n=8)

Tab. 5 Results of rabbit skin irritation test after single administration of Zhengrutie cataplasm(n=8)

组别	末次给药后时间/h	空白基质组	正乳贴组	正乳贴刺激性强度
完整皮肤组	1	0	0	无刺激性
	24	0	0	无刺激性
	48	0	0	无刺激性
	72	0	0	无刺激性
破损皮肤组	1	0	0	无刺激性
	24	0	0	无刺激性
	48	0	0	无刺激性
	72	0	0	无刺激性

2.4.2 多次给药对兔皮肤刺激试验

2.4.2.1 动物分组及给药方式 另取 8 只健康家兔，处理方法及破损皮肤模型的建立同单次给药“2.4.1.1”项下方法相同，每天给药 1 次，用胶带环绕固定，防止被舔咬并保持 6 h，连续 7 d。每天给药前观察给药局部皮肤刺激情况，并记录、评分。停药后观察 1，24，48，72 h 对皮肤的刺激反应。除观察并记录每日的红斑及水肿情况进行评分外，还观察涂抹部位是否有色素沉着，出血点，皮肤粗糙或皮肤菲薄等情况、记录发生时间及消退时间。

2.4.2.2 多次给药皮肤刺激试验结果 连续多次给药后，完整皮肤组动物未见红斑或水肿，平均积分值均为 0；破损皮肤组：第 1~6 天去除药物 1 h 后，空白基质组侧和正乳贴组侧均出现勉强可见的红斑，平均积分值 0.25，属无刺激性，第 7 天给药前空白基质组侧和正乳贴侧均出现勉强可见的红斑，平均积分值 0.25，属无刺激性，去除药物 1 h 后，空白基质组侧出现勉强可见的红斑，平均积分值 0.25，属无刺激性，正乳贴组侧有 1 只动物出现勉强可见的红斑和水肿，平均积分值 0.5，属轻度刺激。连续给药结束后 24 h，破损皮肤组动物空白基质组侧和正乳贴组侧出现勉强可见的红斑，平均积分值 0.5，属无刺激性，48 h 后皮肤恢复正常。结果见表 6。

表 6 正乳贴凝胶贴膏多次给药对家兔皮肤刺激性试验结果(n=8)

Tab. 6 Results of rabbit skin irritation test after multiple administration of Zhengrutie cataplasm(n=8)

组别	末次给药后时间/h	空白基质组	正乳贴组	正乳贴刺激性强度
完整皮肤组	1	0	0	无刺激性
	24	0	0	无刺激性
	48	0	0	无刺激性
	72	0	0	无刺激性
破损皮肤组	1	0.25	0.25	无刺激性
	24	0.25	0.50	轻度刺激
	48	0	0	无刺激性
	72	0	0	无刺激性

注：平均积分值=0.25，属无刺激性。

Note: Average integral value was 0.25, which was non irritating.

3 讨论

本研究前期制剂的质量标准研究时选用君药独一味中木犀草素、山栀苷甲酯和 8-*O*-乙酰山栀苷甲酯作为质量控制指标，由于体外透皮扩散池体积小，限制了固定时间段内接收液的取样量，加之接收液中木犀草苷本身的累积透过量低，导致水解后接收液中木犀草素的含量较低，达不到 HPLC 有效的检测线，故本实验选用独一味中的山栀苷甲酯+8-*O*-乙酰山栀苷甲酯，冰片和樟脑作为透皮接收液中的质量控制指标，评价其体外透皮特性。处方中山栀苷甲酯和 8-*O*-乙酰山栀苷甲酯相对分子质量小，易溶于水，容易透过皮肤，冰片和樟脑相对分子质量小，但微溶于水，既是消肿止痛的有效成分，又可以有效促进药物经皮渗透作用，使得药物分子容易穿透皮肤角质层进入表皮组织中，发挥活血止痛、消肿散结的作用，也避免接收液中加入表面活性剂而导致皮肤屏障功能遭到破坏。

本实验体外透皮过程研究发现，受巴马香幼猪皮肤厚度差异和皮肤角质层完整性影响，不同扩散池有效成分累积透过量差异大，导致试验重复性差，故选择测定皮肤 TEWL 值评价巴马香幼猪离体皮肤的完整性，保证实验用离体皮肤角质

层未被破坏，皮肤屏障功能良好；通过测量皮肤的厚度，进一步控制实验用皮肤厚度差异及生理病理对有效成分体外透皮效果的影响，降低体外透皮过程中不同扩散池之间有效成分累积透过量的差异性。实验对比考察了不同接收液和磁力搅拌速度对指标成分的累积透过影响，结果发现当接收液为磷酸盐缓冲液(pH=7.2)时，山栀苷甲酯+8-*O*-乙酰山栀苷甲酯、冰片、樟脑的累积透过量最高；当磁力搅拌速度为 600 r·min^{-1}，冰片、樟脑累积透过效果最好，山栀苷甲酯+8-*O*-乙酰山栀苷甲酯累积透过效果整体较 500 r·min^{-1} 相差不大(累积透过量 $Q_{600\ r\cdot min^{-1}} \approx Q_{500\ r\cdot min^{-1}}$，渗透速率常数 $J_{ss600\ r\cdot min^{-1}} \approx J_{ss500\ r\cdot min^{-1}}$)，原因可能与指标成分的物化性质、透皮扩散池的有效透过面积及皮肤的完整性相关，实验后期会进一步验证；此外，冰片、樟脑脂溶性高，从基质中释放的速度较快，容易穿透角质层，且本身具有一定的促透作用，故累积透过效果较好[17]。

根据体外透皮试验结果显示，正乳贴凝胶贴膏中山栀苷甲酯+8-*O*-乙酰山栀苷甲酯、冰片和樟脑 24 h 的累积透过量分别为 14.14，348.21，490.97 μg·cm^{-2}，透过规律均符合零级动力学方程，说明该制剂贴敷于皮肤后有效成分以恒定速率透过皮肤。通过正乳贴凝胶贴膏对皮肤的安全性研究结果发现，该制剂对完整皮肤无任何刺激作用，对破损皮肤有轻微的刺激作用，提示该制剂对皮肤发生破损、溃烂、流脓等现象不建议使用，以免引起二次损伤。

本实验研究结果显示，正乳贴凝胶贴膏中有效成分可顺利穿透皮肤的屏障功能，对完整性皮肤未发现刺激性与致敏性，对该制剂的临床应用可提供数据支持。此外，本实验研究过程中尚未对透皮实验结束后膏体的残留量、有效渗透面积皮肤的滞留量进行测定，后期实验将进一步进行体外释放与体外透皮内容的补充和增加药效学相关实验的研究，并将继续探索不同 pH 值的磷酸盐缓冲液对指标成分的累积透过特性。

REFERENCES

[1] 中国药典. 四部[S]. 2020: 22.

[2] HAN S, FENG S H, MA X W, et al. Research progress on Chinese materia medica gel plaster and its application in product development[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2018, 49(21): 5197-5204.

[3] 陈佃红. 乳腺增生疾病研究进展[J]. 世界最新医学信息文摘, 2019, 19(26): 112, 114.

[4] 张樱山, 陈丽娟, 魏学明, 等. 藏药新药正乳贴治疗乳腺增生的临床研究[Z]. 甘肃奇正藏药有限公司, 2015-05-03.

[5] FDA. Guidance for Industry Residual Drug in Transdermal and Related Drug Delivery Systems[S]. 2011.

[6] The Transdermal Drug Administration Committee of the World Federation of Chinese Medicine Societies. Discussion of professional consensus on the technical practice of the *in vitro* permeation test for topical and transdermal preparations[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2022, 39(8): 1128-1132.

[7] SIMON G A, MAIBACH H I. The pig as an experimental animal model of percutaneous permeation in man: Qualitative and quantitative observations: An overview[J]. Skin Pharmacol Appl Skin Physiol, 2000, 13(5): 229-234.

[8] CHILCOTT R P, DALTON C H, ASHLEY Z, et al. Evaluation of barrier creams against sulphur mustard: (II) *in vivo* and *in vitro* studies using the domestic white pig[J]. Cutan Ocular Toxicol, 2007, 26(3): 235-247.

[9] ZHU H Y, WU Y B, LU W D, et al. Skin models and critical quality control for the studies of transdermal drug delivery systems[J]. Chin J Pharm(中国医药工业杂志), 2022, 53(5): 592-600, 591.

[10] FDA. Transdermal and Topical Delivery Systems-Product Development and Quality Considerations Guidance for Industry[S]. 2019.

[11] TIANGCO C, ANDAR A, QUARTERMAN J, et al. Measuring transdermal glucose levels in neonates by passive diffusion: An *in vitro* porcine skin model[J]. Anal Bioanal Chem, 2017, 409(13): 3475-3482.

[12] 原中华人民共和国卫生部药政局. 中药新药研究指南(药学、药理、毒理学)[M]. 1993: 211-212.

[13] 原国家食品药品监督管理局. 中药、天然药物免疫毒性(过敏性、光变态反应)研究技术指导原则[S]. 2004.

[14] LI J, ZU W, LIU J, et al. Preparation progress of ZnO@$ZnFe_2O_4$ cream and its safety evaluation of skin medication[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2020, 37(23): 2828-2833.

[15] TIAN H, BAO H Y, BAU T. Optimization of matrix formulation of Qufeng Zhitong ointments by response surface methodology and its skin safety test[J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2015, 21(23): 1-6.

[16] WANG W, HE Z W, YANG L, et al. Investigation on skin safety of Kechuan gel plaster[J]. China Pharm(中国药师), 2020, 23(3): 569-572.

[17] XU Y W, LI Z Z, WANG J L, et al. Effect of penetration enhancers on transdermal penetration of post-crosslinking *Daphnes Giraldii Cortex* gel plaster *in vitro*[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2023, 40(7): 903-908.

收稿日期：2022-10-13

(本文责编：李艳芳)