

- [2] Jingyan Wang, Yi Lan, Hui Li, et al. Percutaneous penetration enhancement effect of essential oil of mint (*Mentha haplocalyx* Briq.) on Chinese herbal components with different lipophilicity[J]. *Journal of Traditional Chinese Medical Sciences*, 2014, 1(2): 109-119.
- [3] 兰颐, 王景雁, 陶野, 等. 薄荷油与薄荷醇促进中药成分经皮吸收的对比研究[J]. *中国中药杂志*, 2016, 41(8): 1516-1522.
- [4] Mads Kreilgaard. Assessment of cutaneous drug delivery using microdialysis[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2002, 54(Supplement): S99-S121.
- [5] 丁平田, 魏刚, 李虹, 等. 浓差法用于微渗析回收率的测定[J]. *中国药理学杂志*, 2001, 36(10): 690-694.
- [6] Yong-Tai Zhang, Yue-Ming Xu, Su-Juan Zhang, et al. In vivo microdialysis for the evaluation of transdermal delivery vehicle for cinnamic acid[J]. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 2014, 40(3): 301-307.
- [7] Heather A E Benson, Adam C Watkinson. *Transdermal and Topical Drug Delivery Principles and Practice*[M]. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2011: 131-153.
- [8] 郑俊民. 经皮给药新剂型[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 279-280.
- [9] Yi Lan, Jingyan Wang, Shuwang He, et al. Transdermal permeation of *Zanthoxylum bungeanum* essential oil on TCM components with different lipophilicity[J]. *Journal of Traditional Chinese Medical Sciences*, 2016, 3(3): 157-167.
- [10] 王景雁, 兰颐, 茹庆国, 等. 氮酮对不同亲脂性中药有效成分的经皮促透作用研究[J]. *北京中医药大学学报*, 2016, 39(2): 155-161.
- [11] Yi Lan, Jingyan Wang, Hui Li, et al. Effect of menthone and related compounds on skin permeation of drugs with different lipophilicity and molecular organization of stratum corneum lipids[J]. *Pharmaceutical Development and Technology*, 2016, 21(4): 389-398.
- [12] 张泰. 芳香性中药成分透皮吸收促进作用的研究进展[J]. *中华中医药杂志*, 2019, 34(6): 2589-2592.

(收稿日期: 2020年7月12日)

· 研究报告 ·

乳香没药挥发油促生物碱类成分的经皮渗透性研究

方蕾, 管咏梅, 黄诗雨, 吴璐, 朱卫丰, 陈丽华

(江西中医药大学现代中药制剂教育部重点实验室, 南昌 330004)

摘要: 目的: 以九分散为模型方, 研究乳香、没药挥发油对方中所含生物碱类成分的经皮渗透行为, 分析比较挥发油中促生物碱类经皮渗透的主要化学成分。方法: 应用Franz扩散池法进行体外透皮实验, 分析挥发油促生物碱类成分在小鼠皮肤内的经皮渗透性; 采用GC-MS技术与主成分分析法比较乳香、没药挥发油中主要促透作用的化学成分。结果: 脂溶性生物碱马钱子碱、土的宁与水溶性生物碱盐酸麻黄碱在挥发油的作用下, 累计透皮量-时间曲线符合Higuchi方程, 且各挥发油组促透倍数 ER 均 >1 , 与氮酮作用相似; 经GC-MS与主成分分析, 乳香挥发油、药对挥发油、混合挥发油组中含量最大的化学成分为乙酸辛酯(27.91%), 没药挥发油组中含量最大的化学成分为大根香叶烯(20.01%)。结论: 乳香、没药挥发油对于脂溶性生物碱马钱子碱、土的宁及水溶性生物碱盐酸麻黄碱均存在良好促透效果, 为两亲性天然促透剂; 推测乙酸辛酯、正辛醇与大根香叶烯成分具有促透作用。

关键词: 乳香; 没药; 挥发油; 生物碱类成分; 经皮渗透; 气相色谱-质谱联用; 主成分分析

基金资助: 江西省主要学科学术和技术带头人培养计划(No.20204BCJL22048), 江西省自然科学基金项目(No.20181BAB205078), 江西省重大科技研发专项(No.S2019ZDYFB0027)

Effects of Olibanum and Myrrha volatile oil on the transdermal penetration of alkaloids

FANG Lei, GUAN Yong-mei, HUANG Shi-yu, WU Lu, ZHU Wei-feng, CHEN Li-hua

(Key Laboratory for Modern Preparation of TCM, Ministry of Education, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

通信作者: 陈丽华, 江西省南昌市新建区梅岭大道1688号江西中医药大学现代中药制剂教育部重点实验室, 邮编: 330004
电话: 0791-87118658, E-mail: chly98@163.com

Abstract: Objective: To study the effects of volatile oil of Olibanum and Myrrha on the transdermal osmosis behavior of alkaloids using Jiufen San as model, and to analyze and compare the main chemical components in volatile oil for promoting the transdermal penetration of alkaloids. Methods: The transdermal behavior of alkaloids in mouse skin was analyzed by Franz diffusion cell method. The chemical constituents of volatile oil of Olibanum and Myrrha were analyzed by GC-MS and principal component analysis. Results: The transdermal cumulative amount versus time curve of the lipid-soluble alkaloids brucine, strychnine and water-soluble alkaloid ephedrine hydrochloride were in accordance with Higuchi equation under the action of volatile oil, and the penetration promoting factor *ER* of each volatile oil was greater than one times, which was similar to that of Azone. By GC-MS and principal component analysis, octyl acetate (27.91%) was the most abundant chemical component in the Olibanum volatile oil, drug pair volatile oil and mixed volatile oil groups, and geraniene (20.01%) was the most abundant chemical component in the Myrrha volatile oil. Conclusion: Olibanum and Myrrha volatile oil are amphiphilic natural permeability promoting agents which have good permeability promoting effect on brucine, strychnine and ephedrine hydrochloride. And it is speculated that octyl acetate, n-octyl alcohol and geraniene could have the effect of promoting the transdermal absorption of drugs.

Key words: Olibanum; Myrrha; Volatile oil; Alkaloids; Transdermal penetration; GC-MS; Principal component

Funding: Training Plan for Academic and Technical Leaders of Major Disciplines in Jiangxi Province (No.20204BCJL22048), Natural Science Foundation of Jiangxi Province (No.20181BAB205078), Major Science and Technology Research & Development Projects of Jiangxi Province (No.S2019ZDYFB0027)

挥发油具有止咳平喘、抗菌消炎、活血散瘀、消肿止痛等广泛的药理活性,还可起到良好促透作用^[1-4]。乳香没药挥发油含有醇、酮、萜烯类成分,是中药挥发油的代表性成分。目前,在挥发油经皮促透作用的研究中,模型药物多选用化学药物及中药单体成分,对复方的研究较少。由于挥发油种类及成分的复杂性,对不同的药物可能有不同的经皮促透效果,故本研究以历版《中华人民共和国药典》(以下简称《药典》)均有收载的九分散^[5]为模型方,由马钱子、麻黄、乳香、没药以1:1:1:1配比组成,马钱子、麻黄主含生物碱类成分。采用Franz扩散池法,研究乳香没药挥发油对九分散方中脂溶性生物碱马钱子碱、土的宁与水溶性生物碱盐酸麻黄碱这3种生物碱的经皮促透作用;应用气相色谱-质谱联用(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)与主成分分析^[6],比较乳香没药挥发油单提、混合提取对挥发油化学成分的影响,为深入探讨中药挥发油经皮促透作用提供思路。

材料

1. 动物 SPF级雄性昆明小鼠,4~7周龄,体质量18~22 g,由江西中医药大学实验动物中心提供,动物生产许可证号:SCXK(赣)2018-0003,所有小鼠分笼饲养,适应性喂养7 d,期间可自由饮水,环境温度为(22±2)℃,湿度为(55±5)%,12 h/12 h光照/黑暗交替。本实验获得江西中医药大学实验动物伦理委员会批准(编号:JZLLSC20180622001)。

2. 药材与试剂 乳香、没药药材购于江西江中中药饮片有限公司,由江西中医药大学中药鉴定教研室吴志瑰副教授分别鉴定为橄榄科植物乳香树*Boswellia carterii* Birdw.树皮渗出的树脂及橄榄科植物地丁树*Commiphora myrrha* Engl.的干燥树脂。马钱子碱、土的宁对照品(纯度≥98%,成都普菲德生物技术有限公司,批号分别为17121401、19032003);盐酸麻黄碱对照品(纯度100%,中国食品药品检定研究院,

批号:109X-XPOG);氮酮(纯度97%,上海阿拉丁生化科技股份有限公司,批号:A104374);无水乙醇(西陇科学股份有限公司,批号:190412);氯化钠(西陇科学股份有限公司,批号:170911);磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)溶液(pH=7.4,江苏凯基生物技术股份有限公司,批号:20190704);磷酸二氢钾(国药集团化学试剂有限公司,批号:20170324);庚烷磺酸钠(上海展云化工有限公司,批号:170425);乙腈(色谱纯,美国Tedia公司,批号:A104374);无水硫酸钠(分析纯,西陇化工股份有限公司,批号:20170322);乙酸乙酯(西陇科学股份有限公司,批号:170812);其他试剂均为分析纯,纯水为实验室自制。

3. 仪器 7890A-5975C型气相色谱-质谱联用仪(美国安捷伦科技有限公司);数据库为美国国家标准与技术研究所数据库(National Institute of Standards and Technology, NIST11);KDM型控温电热套(郸城华鲁电热仪器有限公司);TP-6型智能透皮扩散仪及垂直式Franz型扩散池(扩散面积为1.13 cm²,接收池容积为15 mL,天津精拓仪器科技有限公司);Agilent 1260高效液相色谱仪(美国安捷伦公司);ESJ182-4型电子分析天平(十万分之一,沈阳龙腾电子有限公司);KQ-500VDE型双频数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);XW-80A涡旋混合器(上海青浦沪西仪器厂);PH-3C型pH计(上海仪电科学仪器股份有限公司);Finnpipette移液枪(赛默飞世尔科技)。

方法

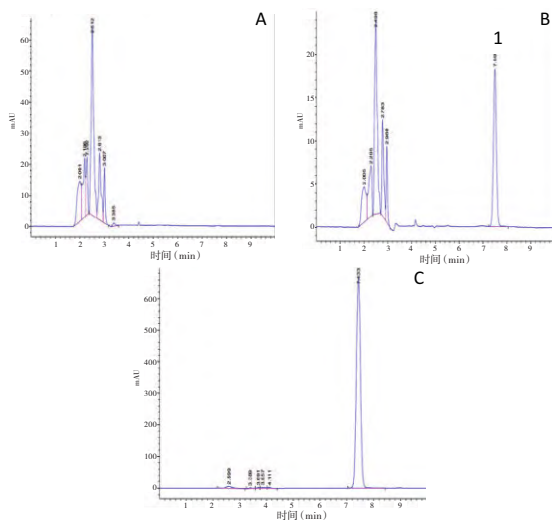
1. 挥发油的提取 乳香、没药挥发油均采用《药典》2020年版四部挥发油提取甲法^[7]提取,得淡黄油状溶液,无水硫酸钠脱水后密封避光保存;混合挥发油为等体积乳香、没药挥发油物理混合;药对挥发油为等质量乳香、没药生药材混合后采用《药典》2020年版四部挥发油提取甲法^[7]提取,得淡黄油状溶液,无水硫酸钠脱水后密封避光保存。

2. 生物碱类成分HPLC测定方法的建立

2.1 液相条件 采用ACE Excel C₁₈色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5.0 μm), 柱温30 ℃, 流速1.00 mL/min, 马钱子碱所用流动相为乙腈-缓冲盐(25:75), 土的宁所用流动相为乙腈-缓冲盐(24:76), 盐酸麻黄碱所用流动相为乙腈-缓冲盐(23:77), 其中缓冲盐为0.01 mol/L庚烷磺酸钠:0.02 mol/L磷酸二氢钾(缓冲盐用10%磷酸调至pH=2.8), 进样量20 μL。马钱子碱测定波长为260 nm, 保留时间约为7.50 min; 土的宁测定波长为260 nm, 保留时间约为10.12 min; 盐酸麻黄碱测定波长为210 nm, 保留时间为9.00 min, 理论塔板数按马钱子碱峰计算不低于5 000。

2.2 对照品溶液和接收液的制备 精密称取10.77 mg马钱子碱对照品、10.00 mg土的宁对照品、10.49 mg盐酸麻黄碱对照品, 用75%甲醇定容至10 mL, 得马钱子碱、土的宁、盐酸麻黄碱对照品溶液。参照文献[4]制备马钱子碱、土的宁、盐酸麻黄碱体外透皮接收液和体外透皮试验空白接收液。

2.3 专属性考察 分别取马钱子碱对照品溶液、土的宁对照品溶液、盐酸麻黄碱对照品溶液、马钱子碱体外透皮接收液、土的宁体外透皮接收液、盐酸麻黄碱体外透皮接收液、体外透皮试验空白接收液, 用0.22 μm滤膜过滤, 按“2.1”项下色谱条件进行HPLC检测, 结果显示, 接收液中其他成分对马钱子碱、土的宁、盐酸麻黄碱的检测无干扰, 见图1-图3。

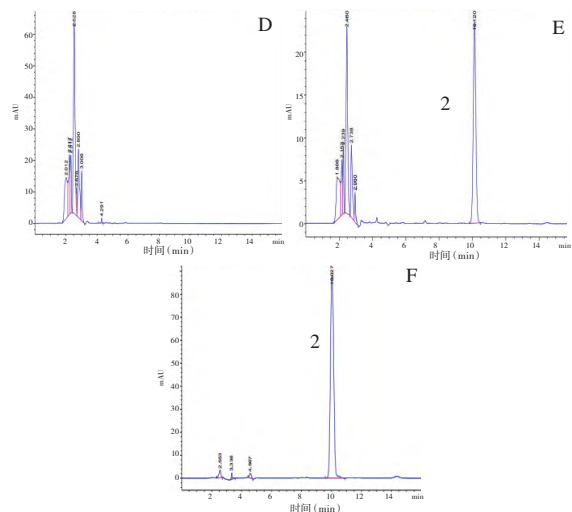


注: A. 空白接收液; B. 马钱子碱体外透皮接收液; C. 马钱子碱对照品溶液; 1. 马钱子碱。

图1 马钱子碱专属性HPLC图

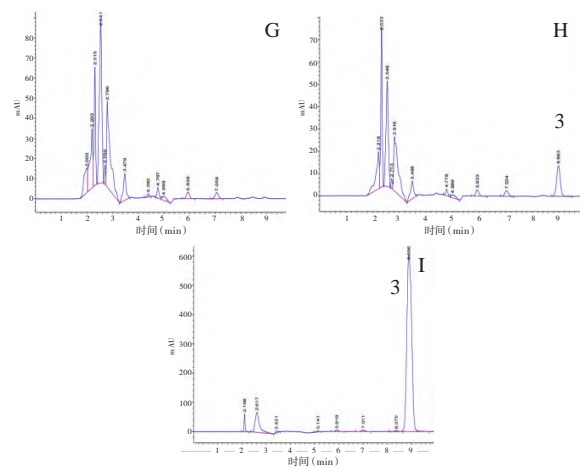
2.4 线性关系考察 精密量取马钱子碱、土的宁、盐酸麻黄碱对照品溶液适量, 分别配制成43.08、21.54、10.77、8.616、5.385、1.7232、0.34464 μg/mL马钱子碱溶液, 50.00、25.00、6.25、3.125、1.5625、0.7813、0.3906 μg/mL土的宁溶液以及41.96、10.49、8.392、5.245、1.6784、0.8392、0.4196 μg/mL盐酸麻黄碱溶液, 按“2.1”项下色谱条件进行测定, 以峰面积(A)

为横坐标, 以溶液质量浓度(C)为纵坐标, 绘制标准曲线, 得到马钱子碱线性方程为 $C=0.0296A-0.0672$ ($R^2=0.9996$), 土的宁线性方程为 $C=0.0268A+0.053$ ($R^2=0.9998$), 盐酸麻黄碱方程为 $C=0.0251A+0.1489$ ($R^2=0.9997$), 表明马钱子碱在0.34464~43.08 μg/mL范围内线性关系良好, 土的宁在0.3906~50.00 μg/mL范围内线性关系良好, 盐酸麻黄碱在0.4196~41.96 μg/mL范围内线性关系良好。



注: D. 空白接收液; E. 土的宁体外透皮接收液; F. 土的宁对照品溶液; 2. 土的宁。

图2 土的宁专属性HPLC图



注: G. 空白接收液; H. 盐酸麻黄碱体外透皮接收液; I. 盐酸麻黄碱对照品溶液; 3. 盐酸麻黄碱。

图3 盐酸麻黄碱专属性HPLC图

2.5 精密性考察 取低、中、高浓度的马钱子碱、土的宁、盐酸麻黄碱对照品溶液, 每一浓度日内反复进样6次, 日内RSD值最大为1.18%, 说明其日内精密性良好; 并且每个浓度3日内反复进样, 日间RSD最大值为2.70%, 均<3%, 说明其日间精密性良好。

2.6 稳定性考察 取马钱子碱、土的宁、盐酸麻黄碱体外透皮24 h透过液, 于0、2、4、8、12、24 h按照“2.1”项下色谱条件进样, 测得马钱子碱RSD为0.50%, 土的宁RSD为0.30%, 盐

麻黄碱RSD为0.60%,表明样品中马钱子碱、土的宁、盐酸麻黄碱稳定性良好。

2.7 加样回收实验 精密吸取马钱子碱、土的宁、盐酸麻黄碱体外透皮24 h透过液,分别加入低、中、高浓度马钱子碱、土的宁、盐酸麻黄碱对照品溶液,按“2.1”项下色谱条件进行测定,结果显示,马钱子碱平均加样回收率是100.23%~105.19%,土的宁平均加样回收率是94.93%~104.95%,盐酸麻黄碱平均加样回收率是101.48%~105.19%,RSD均<5%,表明该方法的准确度良好。

3. 经皮渗透性能的考察

3.1 离体鼠皮制备 取健康雄性小鼠,处死后,用电动剃毛器剃掉腹部毛,立即剥离腹部皮肤,用脱脂棉擦去脂肪组织和黏连物,用0.9%氯化钠溶液冲洗干净,用铝箔包裹后-20℃冷冻保存,1周内用完。

3.2 分组 ①溶剂组:不含挥发油的等浓度的马钱子碱溶液、土的宁溶液、盐酸麻黄碱溶液分别单独渗透小鼠皮肤组,作为阴性对照;②乳香挥发油组:含3%乳香挥发油的等浓度的马钱子碱溶液、土的宁溶液、盐酸麻黄碱溶液分别单独渗透小鼠皮肤组;③没药挥发油组:含3%没药挥发油的等浓度的马钱子碱溶液、土的宁溶液、盐酸麻黄碱溶液分别单独渗透小鼠皮肤组;④药对挥发油组:含3%药对挥发油的等浓度的马钱子碱溶液、土的宁溶液、盐酸麻黄碱溶液分别单独渗透小鼠皮肤组;⑤混合挥发油组:含3%混合挥发油的等浓度的马钱子碱溶液、土的宁溶液、盐酸麻黄碱溶液分别单独渗透小鼠皮肤组;⑥氮酮组:含3%氮酮的等浓度的马钱子碱溶液、土的宁溶液、盐酸麻黄碱溶液分别单独渗透小鼠皮肤组,作为阳性对照。

3.3 供试液的制备 根据九分散处方中生物碱比例,按照“3.2”项下所述分组配制0.26 mg/mL马钱子碱、0.52 mg/mL土的宁与0.26 mg/mL盐酸麻黄碱溶液各6组,溶解马钱子碱、土的宁、盐酸麻黄碱的溶液为20%乙醇-PBS溶液(pH=7.4)^[8],各组在给药之前均涡旋15 min,超声15 min,以保证生物碱成分完全溶解及挥发油分布均匀。

3.4 渗透扩散装置 透皮吸收渗透扩散装置采用改良Franz扩散池。扩散池由两部分组成,上室为供给池,下室为接收池,接收池底部连一个取样管。接收池容积为15 mL,扩散面积1.13 cm²,恒温水浴温度维持在(37.0±0.5)℃,转速300 r/min,取样量为0.5 mL。

3.5 体外透皮实验 剪取面积略大于供给池表面积的皮肤,放置在Franz扩散池的供给池与接收池结合处,使角质层面向供给池,并用弹簧夹固定,先用接收液充满接收池,注意与鼠皮接触部分不能有气泡,平衡30 min后给药,取1 mL供给液置于供给池,使药物与鼠皮充分接触,给药完成后用封口膜封住供给池池口,保持转速与温度,每组平行5份。于1、2、4、6、8、10、12 h取0.5 mL接收液(每次取样后均补加等量的接收液),将取

出的样品用0.22 μm滤膜滤过,用“2.1”项下HPLC条件分别测定马钱子碱、土的宁、盐酸麻黄碱含量,计算累积透皮量。

4. GC-MS实验 分别取100 μL乳香挥发油、没药挥发油、药对挥发油、混合挥发油,用乙酸乙酯稀释至1 mL待测。密封、避光、冷藏。

4.1 GC条件 HP-5MS毛细管柱(30 m×0.25 mm×0.25 mm),接口温度:280℃,进样口温度:200℃,载气为氦气(He),流速:1.00 mL/min,分流比:20:1,进样量为1 μL。程序升温对柱温进行控制:初始温度为60℃,保持5 min;以2℃/min升温至80℃,保持5 min;以5℃/min从80℃升温至150℃,保持5 min;以5℃/min从150℃升温至220℃,保持5 min;以5℃/min从220℃升温至260℃,保持15 min。

4.2 MS条件 电子轰击源(EI);电子能量70 eV;离子源温度200℃;四极杆温度150℃;质量扫描范围30~600 amu。

5. 透皮数据处理 药物的累积透皮量(Q_n)可由公式计算: $Q_n = (Vp_n + \sum_{i=1}^{n-1} p_i V_i) / A$,其中,A为有效扩散面积,V为接受液总体积, p_n 为第n次取样时接收液中药物的质量浓度, p_i 为第i次取样时接受液中药物的质量浓度, V_i 为取样体积;以12 h药物的累积透皮量 Q_{12} (μg/cm²)对取样时间t作曲线,并对曲线进行拟合,预实验结果显示以Higuchi方程拟合最佳,求出的直线斜率即为稳态透皮速率 J_{ss} (μg·cm⁻²·h⁻¹)。直线延伸部分与时间轴相交,即为时滞(t_{lag})。数据用SPSS 22.0统计软件处理,采用One-way ANOVA方法进行统计学分析。以P<0.05为差异有统计学意义。

应用挥发油组或氮酮组时对药物促透比(enhancement ratio, ER)按公式计算: $ER = J_{ss}(\text{加促透剂}) / J_{ss}(\text{不加促透剂})$ 。

6. GC-MS数据分析 将所得数据经计算机检索及质谱图解析确定化合物,并采用峰面积归一法计算相对百分含量结果。以乳香挥发油组、药对挥发油组与混合挥发油组中7个共有峰的峰面积为变量,得到3×7的数据矩阵,以没药挥发油组、药对挥发油组与混合挥发油组中15个共有峰的峰面积为变量,得到3×15的数据矩阵,使用SPSS 22.0软件进行主成分分析,将二维数据矩阵导入到SPSS 22.0软件进行多变量统计分析。以P<0.05为差异有统计学意义。

结果

1. 体外透皮实验结果

1.1 马钱子碱体外透皮情况 见图4,表1。与溶剂组比较,各挥发油组对脂溶性马钱子碱的促透倍数均>1,稳态流速 J_{ss} 、12 h累计透过量 Q_{12} 均显著提高($P<0.01$, $P<0.05$),表明各组挥发油对马钱子碱均有良好促透效果,与氮酮组作用相似,组间促透倍数无显著性差异。

1.2 土的宁体外透皮情况 见图5,表2。与溶剂组比较,各挥发油组对脂溶性土的宁的促透倍数均>1,稳态流速 J_{ss} 、12 h累计透过量 Q_{12} 均显著提高($P<0.01$, $P<0.05$),表明各组挥发油

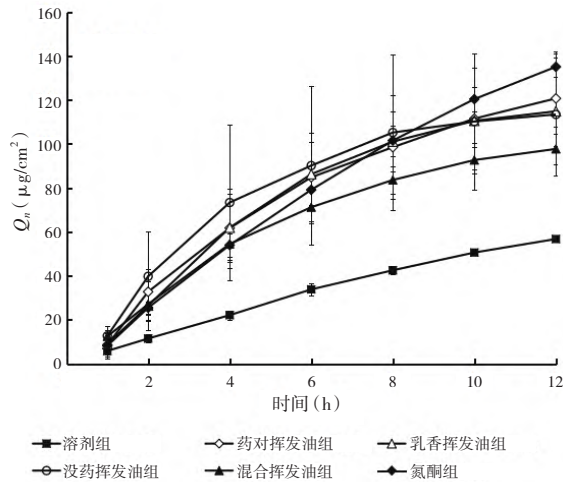


图4 马钱子碱体外透皮曲线 (n=5)

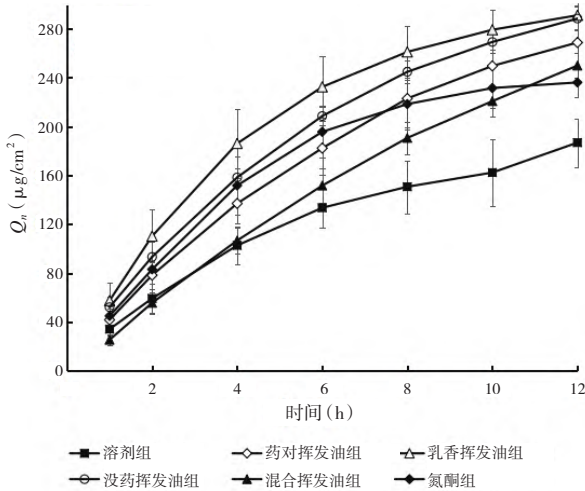


图5 士的宁体外透皮曲线 (n=5)

对士的宁均有良好的促透效果,与氮酮组作用相似,组间促透倍数无显著性差异。

1.3 盐酸麻黄碱体外透皮情况 见图6,表3。与溶剂组比较,各挥发油组对水溶性盐酸麻黄碱的促透倍数均>3,稳态流速 J_{ss} 、12 h累计透过量 Q_{12} 均显著提高($P<0.01$),表明各组挥发油对盐酸麻黄碱均有良好的促透效果,与氮酮组作用相似,组间促透倍数无显著性差异。

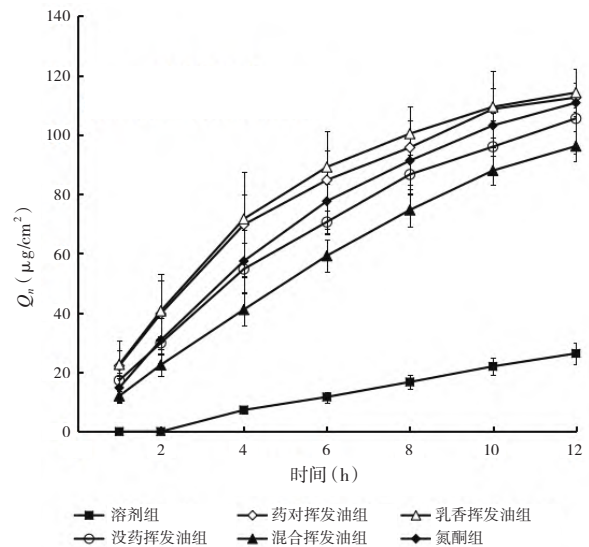


图6 盐酸麻黄碱透皮曲线 (n=5)

2. GC-MS结果

2.1 挥发油化学成分分析结果 见表4。乳香挥发油中鉴定出26种成分,占挥发油总量的82.54%,其中相对含量较大且>1%的有乙酸辛酯(27.91%)、反式-橙花叔醇(25.84%)、右旋

表1 马钱子碱体外透皮数据 (n=5)

组别	回归方程	$J_{ss} (\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1})$	$Q_{12} (\bar{x} \pm s, \mu\text{g}/\text{cm}^2)$	ER	$t_{lag} (\text{h})$
溶剂组	$y=21.355x-17.934, R^2=0.9933$	21.355	56.72 ± 0.58	-	0.71
乳香挥发油组	$y=45.547x-33.347, R^2=0.9775$	45.547**	$114.85 \pm 7.19^{**}$	2.13	0.73
没药挥发油组	$y=41.436x-18.799, R^2=0.9530$	41.436**	$113.40 \pm 27.58^{**}$	1.94	0.21
药对挥发油组	$y=45.685x-32.434, R^2=0.9916$	45.685**	$120.69 \pm 21.44^{**}$	2.14	0.50
混合挥发油组	$y=35.947x-21.067, R^2=0.9867$	35.947*	$97.71 \pm 6.98^*$	1.68	0.34
氮酮组	$y=61.189x-24.096, R^2=0.9919$	61.189**	$135.06 \pm 4.39^{**}$	2.87	0.16

注:与溶剂组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。表2-表3同。

表2 士的宁体外透皮数据 (n=5)

组别	回归方程	$J_{ss} (\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1})$	$Q_{12} (\bar{x} \pm s, \mu\text{g}/\text{cm}^2)$	ER	$t_{lag} (\text{h})$
溶剂组	$y=61.189x-24.096, R^2=0.9919$	61.189	186.88 ± 19.82	-	0.16
乳香挥发油组	$y=96.736x-22.938, R^2=0.9702$	96.740**	$291.09 \pm 11.37^{**}$	1.58	0.24
没药挥发油组	$y=98.692x-42.211, R^2=0.9935$	98.692**	$288.42 \pm 9.47^{**}$	1.61	0.18
药对挥发油组	$y=95.084x-52.943, R^2=0.9972$	95.084**	$268.78 \pm 30.27^{**}$	1.55	0.31
混合挥发油组	$y=92.58x-72.812, R^2=0.9981$	92.580**	$249.90 \pm 10.08^{**}$	1.51	0.62
氮酮组	$y=81.735x-24.58, R^2=0.9587$	81.735**	$236.14 \pm 12.41^*$	1.34	0.09

萜二烯 (4.48%)、Neocembren A (4.31%)、正辛醇 (2.70%)、D2-Carene (2.63%)、月桂酸 (1.34%)、芳樟醇 (1.29%) 8个, 占挥发油总量的70.5%。

没药挥发油中鉴定出20种成分, 占挥发油总量的79.28%, 其中相对含量较大且>1%的有大根香叶烯 (20.01%)、4-ethenyl-4-methyl-1-(propan-2-yl)-3-(prop-1-en-2-yl)cyclohexene (14.45%)、β-榄香烯 (10.39%)、α-蒎烯 (6.40%)、莜术烯 (5.59%)、d-杜松烯 (3.03%)、α-波旁烯 (2.76%)、甘香烯 (2.75%)、花柏烯 (2.20%)、β-依兰烯 (2.03%)、(-)-g-榄香烯 (1.53%)、α-榄香醇 (1.53%)、β-桉叶烯 (1.14%)、Naphthalene, 1,2,4a,5,6,8a-hexahydro-4,7-dimethyl-1-(1-methylethyl)- (1.09%) 14个, 占挥发油总量的74.9%。

药对挥发油中鉴定出29种成分, 占挥发油总量的73.36%, 其中相对含量较大且>1%的有乙酸辛酯 (13.98%)、反式-橙花叔醇 (10.96%)、大根香叶烯 (8.21%)、β-榄香烯 (7.89%)、4-ethenyl-4-methyl-1-(propan-2-yl)-3-(prop-1-en-2-yl)cyclohexene (5.54%)、α-蒎烯 (3.29%)、莜术烯 (2.96%)、d-杜松烯 (2.64%)、(-)-g-榄香烯 (2.54%)、α-波旁烯 (2.53%)、D2-Carene (1.55%)、β-依兰烯 (1.43%)、α-榄香醇 (1.05%)、β-桉叶烯 (1.01%) 14个, 占挥发油总量的65.58%。

混合挥发油中鉴定出36种成分, 占挥发油总量的76.59%, 其中相对含量较大且>1%的有乙酸辛酯 (13.53%)、反式-橙花叔醇 (12.46%)、大根香叶烯 (10.28%)、4-ethenyl-4-methyl-1-(propan-2-yl)-3-(prop-1-en-2-yl)cyclohexene (6.18%)、β-榄香烯

(3.85%)、莜术烯 (3.38%)、α-蒎烯 (3.14%)、(-)-g-榄香烯 (2.23%)、右旋萜二烯 (1.80%)、d-杜松烯 (1.47%)、(-)-β-波旁烯 (1.44%)、正辛醇 (1.11%)、β-依兰烯 (1.08%)、D2-Carene (1.08%) 14个, 占挥发油总量的63.03%。

2.2 挥发油主成分分析结果 乳香挥发油组、药对挥发油组与混合挥发油组的主成分分析结果见表5-表6。右旋萜二烯、正辛醇、芳樟醇、反式-橙花叔醇在主成分1上有较高载荷, 乙酸辛酯在主成分2上有较高载荷, 主成分1和主成分2包含了5种挥发油类成分的主要信息, 这说明乳香在药对挥发油组、混合挥发油组中起到主要作用的成分为这5种化学成分。

表6 乳香挥发油组、药对挥发油组与混合挥发油组旋转变换后的因子载荷矩阵

指标	主成分	
	1	2
右旋萜二烯 (D-Limonene)	0.992	0.126
正辛醇 (1-Octanol)	0.997	0.077
芳樟醇 (Linalool)	0.996	0.094
乙酸辛酯 (Octyl acetate)	-0.397	0.918
反式-橙花叔醇 (Nerolidol)	0.998	0.061
月桂酸 (Dodecanoic acid)	-0.742	-0.670
D2-Carene	-0.772	0.635

没药挥发油组、药对挥发油组与混合挥发油组的主成分分析结果见表7-表8。α-萜澄茄油烯、β-依兰烯、opropa[1,2]

表3 盐酸麻黄碱体外透皮数据 (n=5)

组别	回归方程	$J_{ss} (\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1})$	$Q_{12} (\bar{x} \pm s, \mu\text{g}/\text{cm}^2)$	ER	tlag (h)
溶剂组	$y=11.167x-14.041, R^2=0.9700$	11.17	26.33 ± 3.68	-	1.58
乳香挥发油组	$y=38.249x-10.875, R^2=0.9771$	38.25**	$114.22 \pm 7.99^{**}$	3.42	0.08
没药挥发油组	$y=36.746x-19.868, R^2=0.9974$	36.75**	$105.49 \pm 12.02^{**}$	3.29	0.54
药对挥发油组	$y=37.605x-11.49, R^2=0.9841$	37.61**	$112.55 \pm 4.86^{**}$	3.37	0.09
混合挥发油组	$y=35.499x-26.532, R^2=0.9954$	35.50**	$96.18 \pm 5.18^{**}$	3.18	0.75
氮酮组	$y=40.108x-24.095, R^2=0.9951$	40.11**	$110.80 \pm 1.70^{**}$	3.59	0.36

表5 乳香挥发油组、药对挥发油组与混合挥发油组主成分的特征值及贡献率

主成分	初始			旋转后		
	特征值	方差贡献率 (%)	累积方差贡献率 (%)	特征值	方差贡献率 (%)	累积方差贡献率 (%)
1	5.270	75.28	75.28	5.270	75.28	75.28
2	1.730	24.72	100.00	1.730	24.72	100.00

表7 没药挥发油组、药对挥发油组与混合挥发油组主成分的特征值及贡献率

主成分	初始			旋转后		
	特征值	方差贡献率 (%)	累积方差贡献率 (%)	特征值	方差贡献率 (%)	累积方差贡献率 (%)
1	11.382	75.882	75.882	11.382	75.882	75.882
2	3.618	24.118	100.000	3.618	24.118	100.000

表4 各挥发油组化学成分GC-MS分析结果

序号	化合物名称	分子式	乳香挥发油组		没药挥发油组		药对挥发油组		混合挥发油组	
			保留时间 (min)	含量 (%)	保留时间 (min)	含量 (%)	保留时间 (min)	含量 (%)	保留时间 (min)	含量 (%)
1	右旋萜二烯 (D-Limonene)	C ₁₀ H ₁₆	10.41	4.48	-	-	10.32	0.75	10.35	1.80
2	β-罗勒烯 (β-Ocimene)	C ₁₀ H ₁₆	11.48	0.94	-	-	-	-	-	-
3	β-反式罗勒烯 (β-trans-Ocimene)	C ₁₀ H ₁₆	10.92	0.86	-	-	-	-	10.90	0.36
4	(Z)-3,7-二甲基-1,3,6-十八烷三烯	C ₁₀ H ₁₆	-	-	-	-	11.45	0.20	11.45	0.59
5	正辛醇 (1-Octanol)	C ₈ H ₁₈ O	13.10	2.70	-	-	12.93	0.39	13.00	1.11
6	芳樟醇 (Linalool)	C ₁₀ H ₁₈ O	14.64	1.29	-	-	14.54	0.25	14.57	0.54
7	乙酸辛酯 (Octylacetate)	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	23.43	27.91	-	-	23.15	13.98	23.26	13.53
8	右旋香芹酮[D(+)-Carvone]	C ₁₀ H ₁₄ O	24.54	0.56	-	-	-	-	-	-
9	3,5-二甲氧基甲苯 (3,5-Dimethoxytoluene)	C ₉ H ₁₂ O ₂	25.77	0.62	-	-	-	-	-	-
10	4-ethenyl-4-methyl-1-(propan-2-yl)-3-(prop-1-en-2-yl)cyclohexene	C ₁₅ H ₂₄	-	-	33.14	14.45	28.75	5.54	28.75	6.18
11	α-葑烯油烯 (α-Cubebene)	C ₁₅ H ₂₄	-	-	29.11	0.78	29.09	0.26	29.09	0.36
12	α-依兰烯 (α-ylangene)	C ₁₅ H ₂₄	-	-	-	-	29.84	0.65	-	-
13	(+)—环蒜头烯—[(+)-Cyclosativene]	C ₁₅ H ₂₄	-	-	29.66	0.52	-	-	-	-
14	2,6-Octadiene,2,6-dimethyl-	C ₁₀ H ₁₈	29.40	0.62	-	-	-	-	29.43	0.33
15	正癸酸 (Decanoic acid)	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	31.02	0.71	-	-	-	-	-	-
16	α-蒎烯 (α-Copaene)	C ₁₅ H ₂₄	-	-	30.12	6.40	30.07	3.29	30.07	3.14
17	α-波旁烯 (α-Bourbonene)	C ₁₅ H ₂₄	-	-	30.38	2.76	30.36	2.53	-	-
18	(-)-β-波旁烯[(-)-β-Bourbonene]	C ₁₅ H ₂₄	-	-	-	-	-	-	30.34	1.44
19	(-)-莎草烯[(-)-Cyperene]	C ₁₅ H ₂₄	-	-	-	-	30.78	0.10	30.77	0.77
20	α-古芸烯 (α-Gurjunene)	C ₁₅ H ₂₄	-	-	31.17	0.43	31.15	0.57	31.14	0.67
21	β-依兰烯 (β-ylangene)	C ₁₅ H ₂₄	-	-	31.49	2.03	31.47	1.43	31.46	1.08
22	opropyl[1,2]benzene	C ₁₅ H ₂₄	-	-	31.80	0.96	30.51	0.77	31.77	0.35
23	(-)-g-榄香烯 [(-)-g-Elemene]	C ₁₅ H ₂₄	-	-	32.00	1.53	31.98	2.54	31.96	2.23
24	α-榄香烯[α-Elemene (6Cl)]	C ₁₅ H ₂₄	-	-	-	-	32.41	0.85	-	-
25	Naphthalene,1,2,4a,5,6,8a-hexahydro-4,7-dimethyl-1-(1-methylethyl)-	C ₁₅ H ₂₄	-	-	32.27	1.09	34.34	0.42	32.25	0.59
26	α-石竹烯 (α-Caryophyllene)	C ₁₅ H ₂₄	-	-	32.56	0.87	32.53	0.55	32.52	0.43
27	别香橙烯 (Alloaromadendrene)	C ₁₅ H ₂₄	-	-	32.75	0.82	32.73	0.31	32.73	0.56
28	大根香叶烯 (Germacrene D)	C ₁₅ H ₂₄	-	-	33.60	20.01	33.49	8.21	33.51	10.28
29	2-萜烯[(+)-2-Carene]	C ₁₀ H ₁₆	-	-	-	-	-	-	33.11	0.46
30	β-桉叶烯 (β-Eudesmene)	C ₁₅ H ₂₄	-	-	33.67	1.14	33.59	1.01	33.59	0.68
31	(-)-α-蛇床烯[(-)-α-Selinene]	C ₁₅ H ₂₄	-	-	-	-	-	-	33.80	0.84
32	莪术烯 (Curzerene)	C ₁₅ H ₂₀ O	-	-	33.95	5.59	33.94	2.96	33.90	3.38
33	α-Bulnesene	C ₁₅ H ₂₄	-	-	-	-	-	-	34.08	0.68
34	d-杜松烯 (d-Cadinene)	C ₁₅ H ₂₄	-	-	34.17	3.03	34.15	2.64	34.14	1.47
35	α-Calacorene	C ₁₅ H ₂₀	-	-	-	-	-	-	35.20	0.74
36	α-榄香醇 (α-Elemol)	C ₁₅ H ₂₆ O	-	-	35.54	1.53	35.50	1.05	35.49	0.83

(续表4)

序号	化合物名称	分子式	乳香挥发油组		没药挥发油组		药对挥发油组		混合挥发油组	
			保留时间 (min)	含量 (%)	保留时间 (min)	含量 (%)	保留时间 (min)	含量 (%)	保留时间 (min)	含量 (%)
38	月桂酸(Dodecanoic acid)	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	36.78	1.34	-	-	36.55	0.86	36.55	0.83
39	安息香酸苄酯(Benzylbenzoate)	C ₁₄ H ₁₂ O ₂	43.43	0.61	-	-	-	-	-	-
40	2-Isopropyl-5-methyl-9-methylene [4.4.0]dec-1-ene	C ₁₅ H ₂₄	-	-	-	-	-	-	38.90	0.88
41	β-桉叶醇(β-Eudesmol)	C ₁₅ H ₂₆ O	-	-	-	-	-	-	39.29	0.66
42	G-古芸烯(g-Gurjunene)	C ₁₅ H ₂₄	-	-	-	-	-	-	39.47	0.82
43	烟草烯(Thunbergen)	C ₂₀ H ₃₂	47.97	0.97	-	-	-	-	47.96	0.59
44	Neocembren A	C ₂₀ H ₃₂	48.80	4.31	-	-	-	-	-	-
45	β-榄香烯[β-Elemene (6CI)]	C ₁₅ H ₂₄	-	-	30.76	10.39	30.72	7.89	48.74	3.85
46	D2-Carene	C ₁₀ H ₁₆	49.65	2.63	-	-	49.63	1.55	49.62	1.08
47	g-蛇床烯(g-Selinene)	C ₁₅ H ₂₄	-	-	-	-	37.94	0.85	-	-
48	蒎烯(1R)-(+)-α-pinene	C ₁₀ H ₁₆	6.16	0.59	-	-	-	-	-	-
49	β-蒎烯(β-Pinene)	C ₁₀ H ₁₆	8.54	0.67	-	-	-	-	-	-
50	邻甲氧基甲苯(2-Methylanisole)	C ₈ H ₁₀ O	9.46	0.57	-	-	-	-	-	-
51	桉叶油醇(Cineole)	C ₁₀ H ₁₈ O	10.47	0.53	-	-	-	-	-	-
52	葛缕醇(cis-Carveol)	C ₁₀ H ₁₆ O	23.56	0.55	-	-	-	-	-	-
53	橙花乙酸酯(neryl acetate)	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	29.80	0.64	-	-	-	-	-	-
54	乙酸香叶酯(Geranylacetate)	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	30.48	0.79	-	-	-	-	-	-
55	乙酸癸酯(Aceticacid,decylester)	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	31.33	0.80	-	-	-	-	-	-
56	Calarene	C ₁₅ H ₂₄	48.30	0.51	-	-	-	-	-	-
57	1-β-甜没药烯(1-β-Bisabolene)	C ₁₅ H ₂₄	34.16	0.50	-	-	-	-	-	-
58	花柏烯(Chamigrene)	C ₁₅ H ₂₄	-	-	33.73	2.20	-	-	-	-
59	甘香烯(Elixene)	C ₁₅ H ₂₄	-	-	35.73	2.75	-	-	-	-

注：“-”表示未检测到相关数据。

表8 没药挥发油组、药对挥发油组与混合挥发油组旋转变换后的因子载荷矩阵

指标	主成分		指标	主成分	
	1	2		1	2
4-ethenyl-4-methyl-1-(propan-2-yl)-3-(prop-1-en-2-yl)cyclohexene	-0.814	-0.581	别香橙烯(Alloaromadendrene)	-0.778	0.629
α-葶苈茄油烯(α-Cubebene)	-0.984	-0.180	大根香叶烯(Germacrene D)	-0.987	0.163
α-古芸烯(α-Gurjunene)	0.347	0.938	β-桉叶烯(β-Eudesmene)	0.980	0.200
β-依兰烯(β-ylangene)	0.995	0.105	莪术烯(Curzerene)	-0.204	0.979
opropa[1,2]benzene	0.940	-0.342	d-杜松烯(d-Cadinene)	0.997	-0.075
(-)-g-榄香烯[(-)-g-Elemene]	0.666	0.746	α-榄香醇(α-Elemol)	0.984	0.177
Naphthalene,1,2,4a,5,6,8a-hexahydro-4,7-dimethyl-1-(1-methylethyl)-	-0.955	0.295	β-榄香烯[β-Elemene (6CI)]	0.931	-0.366
α-石竹烯(α-Caryophyllene)	0.997	-0.078			

benzene, Naphthalene, 1,2,4a,5,6,8a-hexahydro-4,7-dimethyl-1-(1-methylethyl)-, α -石竹烯、大根香叶烯、 β -桉叶烯、d-杜松烯、 α -榄香醇、 β -榄香烯在主成分1上有较高载荷, α -古芸烯、莪术烯在主成分2上有较高载荷, 主成分1和主成分2包含了12种挥发油类成分的主要信息, 这说明没药在药对挥发油组、混合挥发油组中起到主要作用的成分为这12种化学成分。

讨论

在本研究中, 挥发油组对脂溶性的马钱子碱、土的宁与水溶性的盐酸麻黄碱均表现出良好的促透效果, 稳态流速值 J_{ss} 及12 h累计透过量 Q_{12} 均有显著性提高, ER 均 >1 , 考虑乳香、没药挥发油具有两性促透作用。同时本实验结果显示, 药对、混合挥发油促透效果差异不明显, 这说明复合使用挥发油时, 无论是药对配伍还是物理混合, 这两种挥发油或能发挥协调促透的效果, 但并不是叠加效应^[9]。故探究药对配伍与物理混合时挥发油成分发生的变化是十分有必要的, 且已有研究证明中药挥发油的透皮促透效果与其化学成分具有关联性^[10-11], 故本实验利用GC-MS法与主成分分析法分析挥发油化学成分, 结合挥发油成分含量、主成分分析与文献^[12]研究, 确定占高比例的主成分乙酸辛酯(27.91%)、正辛醇(2.70%)化学成分有促透作用, 同时推测乳香挥发油中反式-橙花叔醇(25.84%)、右旋萜二烯(4.48%)、芳樟醇(1.29%) 3种单一化学成分也具有促透潜力, 没药挥发油中大根香叶烯(20.01%)、 β -榄香烯(10.39%)、莪术烯(5.59%)、d-杜松烯(3.03%)、 β -依兰烯(2.03%)、 α -榄香醇(1.53%)、 β -桉叶烯(1.14%) 7种单一化学成分存在作为化学促透剂的可能。本研究发现, 各挥发油组均极大地缩短了盐酸麻黄碱的时滞, 对水溶性盐酸麻黄碱具有促透作用, 有学者^[13-15]认为, 挥发油中的含氧萜烯类成分对水溶性药物具有促透作用, 结合GC-MS实验结果, 推测乳香挥发油中的乙酸辛酯等含氧萜烯和没药挥发油中的莪术烯等含氧萜烯可能是促进盐酸麻黄碱渗透的主要成分。

综上所述, 本研究探讨了乳香挥发油、没药挥发油、药对挥发油、混合挥发油对脂溶性、水溶性生物碱的促透作用, 从挥发油的配伍、成分、生物碱的溶解性对促透倍数的差异影响进行了分析, 同时对不同配伍的挥发油成分进行了主成分分析, 探索了单一成分的促透性, 这为挥发油促透效果的可控提供了思路。

参 考 文 献

- [1] 张泰. 芳香性中药成分透皮吸收促进作用的研究进展[J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(6): 2589-2592.
- [2] 张建林, 陶玲, 管咏梅, 等. 中药挥发油的促透皮吸收作用及在外用制剂研究中的问题分析[J]. 中草药, 2017, 48(24): 5263-5269.
- [3] Ruan ShiFa, Wang ZhuXian, Xiang ShiJian, et al. Mechanisms of white mustard seed (*Sinapis alba* L.) volatile oils as transdermal penetration enhancers[J]. *Fitoterapia*, 2019, 138: 104195.
- [4] 管咏梅, 陶玲, 朱小芳, 等. 乳香没药挥发油对川芎中阿魏酸促透机制的研究[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(17): 3350-3355.
- [5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 498.
- [6] 毛跟年, 杜磊, 王荣, 等. 乳香、没药挥发油的亚临界R134a萃取及GC-MS分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(6): 6-9.
- [7] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 四部. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 233.
- [8] Haq A, Michniak-Kohn B. Effects of solvents and penetration enhancers on transdermal delivery of thymoquinone: Permeability and skin deposition study[J]. *Drug Delivery*, 2018, 25(1): 1943-1949.
- [9] 张寒, 张彦, 孙艳平, 等. 几种中药挥发油对祛癯凝胶中连翘苷的促透作用比较研究[J]. 中成药, 2014, 36(9): 1979-1982.
- [10] 蒋秋冬, 杨文国, 蔡皓, 等. 透皮促渗中药挥发油的化学成分与中药药性关联性研究[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(13): 2500-2505.
- [11] Herman A, Herman A P. Essential oils and their constituents as skin penetration enhancer for transdermal drug delivery: A review[J]. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2015, 67(4): 473-485.
- [12] 赵金凤. 乳香和没药挥发性成分的分析及其经皮吸收研究[D]. 济南: 山东中医药大学, 2011.
- [13] Willams A C, Barry B W. The enhancement index concept applied to terpene penetration enhancers for human skin and model lipophilic (oestradiol) and hydrophilic (5-fluorouracil) drugs[J]. *Int J Pharm*, 1991, 74(2-3): 157-168.
- [14] Okabe H, Takayama K, Ogura A, et al. Effect of limonene and related compounds on the percutaneous absorption of indomethacin[J]. *Drug Des Delivery*, 1989, 4(4): 313-321.
- [15] Kaushik D, Batheja P, Kilfoyle B, et al. Percutaneous permeation modifiers: Enhancement versus retardation[J]. *Expert Opin Drug Del*, 2008, 5(5): 517-529.

(收稿日期: 2020年7月19日)