

# 生/炒白芥子贴膏穴位贴敷大鼠后 主要有效成分透皮率及皮肤结构情况

金禹彤<sup>1</sup> 吴凌韬<sup>2</sup> 陈姗<sup>1</sup> 宣丽华<sup>1</sup>

1. 浙江中医药大学附属第一医院 杭州 310006 2. 杭州市富阳区中医院

**摘要:** [目的] 研究白芥子贴膏主要有效成分, 以及生/炒白芥子贴膏穴位贴敷后白芥子主要有效成分的透皮率和贴敷部位皮肤结构的改变。[方法] 建立白芥子高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)指纹图谱, 探索白芥子贴膏中主要有效透皮成分。将 36 只 Wistar 大鼠随机分为 9 组(A、B、C、D、E、F、G、H 和 I 组), 除 A 组外其余各组分别贴敷双侧肺俞、脾俞、肾俞穴位, B、D、F、H 组用生白芥子贴膏贴敷, C、E、G、I 组用炒白芥子贴膏贴敷, 各组分别贴敷 2 h 后取下膏药, B、C 组即刻, D、E 组 2 h 后, F、G 组 4 h 后, H、I 组 22 h 后分别处死大鼠, 并剪下贴敷处皮肤样品。以质液联用系统(liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry, LC-MS/MS) 检测左侧穴位皮肤样本中主要有效成分的浓度, 并计算透皮率; 右侧穴位皮肤使用苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色, 以观察皮肤结构变化。[结果] 各时点(0.5、1、2、4、8、12、24 h)白芥子贴膏均能透过皮肤, 而且峰形稳定, 峰面积最大的有效成分为芥子碱硫氰酸盐(sinapine thiocyanate, ST)。生白芥子贴膏组(B、D、F 组)贴敷处 ST 透皮率均显著高于同时点炒白芥子贴膏组(C、E、G 组), 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 而 22 h 组(H、I 组)ST 透皮率差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。B、D、F、H 组 ST 透皮率均逐渐降低, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); C、E、G 组 ST 透皮率均逐渐降低, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), G 组与 I 组之间差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。各组大鼠肺俞、脾俞与肾俞穴位间比较, ST 透皮率差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。HE 染色结果显示, 贴敷后各组大鼠皮肤组织结构较 A 组疏松, 生白芥子贴膏组(B、D、F 组)较炒白芥子贴膏组(C、E、G 组)疏松更加明显, 其中以生/炒白芥子贴膏 2 h 组(B、C 组)皮肤结构松散最明显, 4 h(D、E 组)皮肤开始逐渐恢复, 22 h(H、I 组)皮肤结构较整齐。[结论] 白芥子贴膏主要有效成分为 ST, 生白芥子贴膏药物有效成分 ST 的透皮率高于炒白芥子贴膏, 并且贴敷处皮肤角质层结构更加疏松, 更有利于药物的渗透及临床疗效的提高。

**关键词:** 白芥子; 穴位贴敷; 有效成分; 透皮; 皮肤结构; 芥子碱硫氰酸盐

中图分类号: R245 文献标志码: A 文章编号: 1005-5509(2022)11-1171-10

DOI: 10.16466/j.issn1005-5509.2022.11.001

**Main Active Ingredients Transdermal Rate and Skin Structure of Rats with Raw/Fried White Mustard Paste** JIN Yutong<sup>1</sup>, WU Lingtao<sup>2</sup>, CHEN Shan<sup>1</sup>, et al 1. *The First Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou(310006), China;* 2. *Hangzhou Fuyang District Hospital of Traditional Chinese Medicine*

**Abstract:** [Objective] To investigate the main active ingredients of white mustard, as well as changes of skin transdermal rate of the main active ingredients and skin structure at the application site after application of raw/fried white mustard paste. [Methods] It established the high-performance liquid phase(HPLC) fingerprint of white mustard, and explored the main effective transdermal components in white mustard plaster. Thirty-six Wistar rats were randomly divided into 9 groups(groups A, B, C, D, E, F, G, H and I), and all groups except group A were given acupoint application to the points of Feishu, Pishu and Shenshu on the bilateral. The B, D, F, H groups were applied with raw white mustard plaster, while the C, E, G, I groups were applied with fried white mustard plaster, all of which removed the plaster after applying for 2 h. The rats were sacrificed and the skin samples were cut at the following time: Groups B and C immediately after being removed the plaster, groups D, E 2 h after removed the plaster, groups F, G 4 h after removed the plaster, groups H, I 22 h after removed the plaster. Then it measured the concentration of main active ingredients in the skin sample of left acupoints with liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry(LC-MS/MS) and calculated the transdermal rate; meanwhile, detected the skin structure of the skin sample of right acupoints with hematoxylin-eosin(HE) staining. [Results] White mustard seed paste can penetrate the skin at various time points(0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 24 h), and the peak shape was stable. The active ingredient with the largest peak area was sinapine thiocyanate(ST). The ST transdermal rate at the application site of the raw white mustard paste groups(group B, D, F) was signifi-

基金项目:浙江省重大科技专项计划项目(2014C03046-2);国家自然科学基金项目(82004454);浙江省中医药科技计划项目(2021ZQ035)

Fund projects: Zhejiang Province Major Science and Technology Special Fund Project(2014C03046-2); National Natural Science Foundation Project(82004454); Zhejiang Traditional Chinese Medicine Science and Technology Project(2021ZQ035)

通信作者:宣丽华, E-mail: xlh1083@163.com

cantly higher than the fried white mustard paste groups(group C, E, G), there was significant difference( $P<0.05$ ); however, there was no significant difference in the ST transdermal rates between H and I groups( $P>0.05$ ). The transdermal rates of ST in groups B, D, F and H gradually decreased, and in groups C, E and G decreased gradually, the difference was statistically significant( $P<0.05$ ), but there was no significant difference between groups G and I( $P>0.05$ ). There was no significant difference in ST transdermal rate among Feishu, Pishu and Shenshu in each group( $P>0.05$ ). HE staining showed that the skin structure of the applied rats in each group was looser than that in group A, and the skin structure of the raw white mustard plaster groups(group B, D, F) was looser than the fried ones(groups C, E, G). In addition, the skin structure in groups B and C was the loosest in all application groups after the application of raw/fried white mustard plaster for 2 h; in groups D and E, the skin structure began to gradually recover; the skin structure of groups H and I was neat. [Conclusion] The main active ingredient of white mustard paste is ST, and the transdermal rate of ST in raw white mustard plaster is higher than fried one. In addition, the structure of the skin stratum corneum at the application site is looser, which is more conducive to the penetration of drugs and the improvement of clinical efficacy.

**Key words:** white mustard seed; acupoint application; active ingredient; transdermal; skin structure; sinapine thiocyanate

研究证实,穴位贴敷疗法在防治呼吸道过敏性疾病方面具有很大的优势<sup>[1-2]</sup>。明末清初张璐所著《张氏医通》中所记载的,将白芥子、细辛、甘遂、延胡索以生姜汁调和制成的哮喘方流传至今。关于生/炒白芥子贴膏穴位贴敷对于呼吸道过敏性疾病的疗效差异,目前仍存在争议<sup>[3]</sup>。前期研究证实,生白芥子贴膏穴位贴敷治疗大鼠过敏性鼻炎的效果显著优于炒白芥子贴膏,并进一步探讨了其免疫调节机制<sup>[4]</sup>。Chen等<sup>[5]</sup>发现,生白芥子贴膏穴位贴敷后,有效成分并未渗入大鼠血液,而是在皮肤中滞留,从而发挥药效。另有研究报道,膏药外敷于大鼠腹部皮肤可改变其皮肤结构<sup>[6]</sup>,而生白芥子经过炒制后,有效成分的含量会有所变化<sup>[7]</sup>。本研究试图从药物透皮角度,探索生/炒白芥子贴膏疗效的差异,即基于穴位贴敷后贴敷部位皮肤角质层结构变化,以及贴膏有效成分在皮肤中的渗透效率,对生/炒白芥子贴膏穴位贴敷的透皮作用进行研究。

## 1 材料和方法

**1.1 实验动物** 无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级健康雄性Wistar大鼠36只,体质量250~300 g,由浙江中医药大学动物实验研究中心提供[实验动物使用许可证号:SYXK(浙)2013-0184]。所有大鼠分笼饲养,室温21~25℃,湿度60%~70%,自由摄食,正常喂水,12 h昼夜节律,适应性喂养1周后进行后续实验。本研究根据《实验动物的保护及使用原则》进行动物实验,遵守动物福利和伦理原则。

**1.2 实验试剂** 芥子碱硫氰酸盐(sinapine thiocyanate, ST)对照品由中国药品生物制品检定所提供(批号:111702-201504);甲醇(色谱纯)、乙腈(色谱纯)均购于德国Merck公司(批号:1.06007.4008,1.06035.2500);生白芥子粉(批号:161116、161255、162214、162324、

162328、162871、163233、163243、164331、169921)及炒白芥子粉(批号:167113)均购于天瑞生物公司。

**1.3 穴位贴敷贴膏制备** 中药购于浙江中医药大学附属第一医院中药房,在制剂室制剂师的指导下进行制备。生/炒白芥子:延胡索:细辛:甘遂比例为2:2:1:1,将药物研磨成粉,混匀后用生姜汁调和成糊状,药物与姜汁比例为2:1,制成0.5 cm×0.5 cm×0.3 cm的药饼,每个质量约1 g,置冰箱备用。采用高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)测定,生白芥子贴膏每个药饼中ST含量为1 133 μg,炒白芥子贴膏每个药饼中ST含量为851 μg。

**1.4 仪器设备** ABI 4000Qtrap型质谱仪购于美国Waters公司;5810、5415R离心机均为德国Eppendorf公司产品;Sartorius电子天平购于北京赛多利斯仪器系统有限公司。

**1.5 白芥子HPLC指纹图谱的建立以及主要透皮成分的确立**

**1.5.1 色谱条件** Agilent TC-C18色谱柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A)-0.1%磷酸溶液(B);柱温35℃,检测波长254 nm,流速1.0 mL·min<sup>-1</sup>,进样量10 μL;梯度洗脱:0~10 min, 2%~15%A;10~15 min, 15%~30%A;15~25 min, 30%~45%A;25~30 min, 45%~100%A;30~35 min, 100%A。

**1.5.2 对照品溶液制备** 精密吸取标准对照品ST溶液1 mg·mL<sup>-1</sup>,以0.08 mol·L<sup>-1</sup>的磷酸盐溶液稀释,定容至1.0 mL,得到一系列ST标准对照品溶液。

**1.5.3 白芥子水提取物制备** 将生白芥子粉碎,过30目筛,称取20 g,以蒸馏水300 mL冷浸1 h后煎煮30 min,过滤后再加200 mL蒸馏水煎煮20 min,过滤后合并滤液,蒸去溶剂成膏状。准确称取提取物浸膏0.1 g,加蒸馏水溶解并定容至50 mL,过0.45 μm微孔滤膜,保

存备用。

**1.5.4 白芥子乙醇提取物制备** 将生白芥子粉碎,过30目筛,称取粉末5 g,以90%乙醇50 mL室温下密闭浸泡48 h。加热回流两次,第一次30 min,过滤后药渣再加入90%乙醇30 mL回流20 min,合并二次滤液,挥去乙醇,制成黏稠膏体。提取物浸膏0.1 g,加甲醇溶解,定容至50 mL,过0.45 μm微孔滤膜,保存备用。

**1.5.5 白芥子HPLC方法建立** HPLC法以液体为流动相,通过高压输液系统,把供试品溶液(如白芥子水提溶液或乙醇溶液)泵入装有固定相的色谱柱,在柱内分离各成分后,进入检测器进行检测,进行精密实验、稳定性实验、重复性实验、线性关系考察等。

**1.5.6 白芥子HPLC指纹图谱建立和ST含量测定**

**1.5.6.1 共有峰的指定** 根据10份白芥子HPLC图谱的相关参数,选择色谱图中可用于反映其内在质量的共有峰,确定水提取样品指定共有峰L个,醇提取样品指定共有峰X个,所选择的共有峰面积之和占总峰面积的90%以上,可以较为全面地反映样品的内在质量。

**1.5.6.2 白芥子不同提取溶剂相似度分析** 根据建立的指纹图谱方法,将10份白芥子样品进样分析和测定,采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012 1.0版)软件,设定色谱峰自动匹配,按照中位数法生成对照指纹图谱,并进行整体相似度评价。

**1.5.6.3 白芥子不同提取溶剂比较测定** 根据10份白芥子HPLC图谱的相关参数,根据ST标准曲线计算不同提取溶剂中白芥子的ST含量。

**1.5.7 白芥子贴膏的制备** 称取生白芥子100 g,加10倍量水回流提取2次,每次1.5 h,滤过;药渣继续采用10倍量乙醇回流提取2次,每次1.5 h,滤过,合并水与乙醇滤液;60 °C减压回收水及乙醇并浓缩,得到浸膏15.4 g,冰箱保存待用;取生姜500 g,粉碎机粉碎,挤出汁液,5 000 r/min离心10 min,得上清液150 mL,冰箱保存待用。在提取物浸膏中加入相应量的姜汁搅拌均匀,得到药膏样品。

**1.5.8 白芥子贴膏有效透皮成分指纹图谱的建立** 采用改良的Franz扩散池,接收介质为0.9%氯化钠溶液。经准备好的大鼠皮肤固定于Franz扩散池上,预平衡1 h后备用。大鼠皮肤角质层向上,皮下组织与接收液密切接触。维持接受液体积为7 mL,温度为(32±0.5) °C,以磁力棒搅拌300 r/min。将5 g贴膏置于大鼠

皮肤中间,分别于给药后0.5、1、2、4、8、12、24 h取出1 mL接收液,取样后立即向接收池中补充32 °C的0.9%氯化钠溶液1 mL,样品经微孔滤膜过滤后行HPLC测定。

**1.6 白芥子贴膏有效成分及在体透皮研究**

**1.6.1 动物分组与处理** 采用随机数字表法将大鼠分为9组:A组(空白对照)、B组(生白芥子贴膏贴敷2 h)、C组(炒白芥子贴膏贴敷2 h)、D组(生白芥子贴膏贴后2 h)、E组(炒白芥子贴膏贴后2 h)、F组(生白芥子贴膏贴后4 h)、G组(炒白芥子贴膏贴后4 h)、H组(生白芥子贴膏贴后22 h)、I组(炒白芥子贴膏贴后22 h),每组4只。

大鼠肺俞、脾俞、肾俞定位参考《实验针灸学》<sup>[8]</sup>及《实验针灸学实验指导》<sup>[9]</sup>,肺俞位于第3胸椎下两旁肋间,脾俞位于第12胸椎下两旁肋间,肾俞位于第2腰椎下两旁。

大鼠背部穴位周围剃毛,再用脱毛膏脱去细毛,清洁局部皮肤后,以纱布吸干多余水分,记号笔确定肺俞、脾俞、肾俞处给药范围,面积0.5 cm×0.5 cm。B、D、F、H组以医用胶布将生白芥子贴膏固定于以上穴位,C、E、G、I组以医用胶布将炒白芥子贴膏固定于以上穴位,2 h揭去胶布和贴膏。B、C组即刻,D、E组2 h后,F、G组4 h后,H、I组22 h后,分别以戊巴比妥腹腔注射麻醉大鼠,剪取肺俞、脾俞、肾俞给药处皮肤,去除毛发及皮下脂肪,以0.9%氯化钠溶液洗净皮肤样本,吸水纸吸干水分,立即精密称重,用眼科剪剪碎,加入pH值5.5的10%乙醇-0.9%氯化钠溶液3 mL,匀浆后3 000 r/min离心10 min,取上清液,0.22 μm滤膜过滤,使用质液联用系统(liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry,LC-MS/MS)分别测定各组大鼠左侧肺俞、脾俞、肾俞皮肤中ST含量,并计算透皮率。以苏木精-伊红(hematoxylin-eosin,HE)染色法将右侧给药处皮肤染色,以观察皮肤结构变化。

**1.6.2 LC-MS/MS检测皮肤中ST含量**

**1.6.2.1 色谱条件** Capcell PAK MG II C18色谱柱(100 mm×2.0 mm,3 μm);流动相:A相:水(含0.1%甲酸),B相:乙腈(含0.1%甲酸);柱温30 °C,流速0.2 mL·min<sup>-1</sup>,进样量1 μL;梯度洗脱:0.0~1.0 min,12%B;1.0~4.0 min,12%~60%B;4.0~4.1 min,60%~12%B;4.1~5.0 min,12%B。

**1.6.2.2 质谱条件** 离子源:电喷雾离子源(electrospray ionization,ESI);检测方式:多反应检测(multiple reaction monitoring,MRM),采用正离子模式,源喷射电压5 500 V,源温度100 ℃;帘气 $1.38 \times 10^5$  Pa;雾化气 $3.45 \times 10^5$  Pa;加热气 $3.79 \times 10^5$  Pa,均为氮气。

**1.6.2.3 对照品溶液制备** 精密吸取标准对照品ST溶液,以 $0.08 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的磷酸盐溶液稀释,定容至1.0 mL,得到一系列ST标准对照品溶液。

**1.6.3 贴敷处皮肤HE染色** 取各组给药部位的皮肤组织,去除毛发及皮下脂肪,漂洗后甲醛溶液固定24 h,石蜡包埋、常规切片,每个标本选取5张切片进行HE染色,具体操作参照《基础医学实验基本技能》<sup>[10]</sup>中石蜡切片制备方法,光镜下观察病理形态学变化。

**1.7 统计学分析** 采用SPSS 22.0统计软件进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,符合正态分布并满足方差齐性的资料,各组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较,满足方差齐性时采用最小显著性差异法(least significant difference,LSD)检验;方差不齐时采用Tamhane's T2检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 白芥子HPLC方法学考察

**2.1.1 精密度实验** 白芥子水提和醇提溶液各峰保留时间相对标准偏差(relative standard deviation,RSD)分别为0.07%和0.06%,峰面积RSD分别为0.98%和0.83%,表明仪器精密度良好。见表1。

**2.1.2 稳定性实验** 白芥子水提和醇提溶液放置不同时间,各峰保留时间RSD分别为0.10%和0.06%,峰面积RSD分别为1.62%和2.11%,表明水提和醇提样品室温放置24 h内稳定。见表2。

**2.1.3 重复性实验** 白芥子水提和醇提溶液不同样品的各峰保留时间RSD分别为0.08%和0.14%,峰面积RSD分别为3.40%和0.78%,表明方法重复性良好。见表3。

**2.1.4 线性关系考察** 配制不同浓度的ST对照品溶液( $0.824, 4.12, 20.6, 103, 515 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ),在相应色谱条件下得到ST的回归方程为 $Y = 6766.4X - 4248.6$  ( $R^2 = 1$ ),ST在 $0.824 \sim 515 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的浓度范围内线性关系良好。

### 2.2 生白芥子指纹图谱的建立和ST含量测定

**2.2.1 白芥子指纹图谱** 根据10份白芥子HPLC图谱的相关参数,选择HPLC色谱图中可反映其内在质量的共有峰进行测定,白芥子水提样品指定共有峰17个,白芥子醇提样品指定共有峰21个,所选择的共有峰面积之和占总峰面积的90%以上,可以较为全面地反映样品的内在质量。1号峰是ST,出峰明显,峰形理想,峰面积最大,表明其含量最高。见图1、2。

**2.2.2 ST含量测定** 根据标准曲线,计算10份不同提取溶剂ST的含量,水提含量为 $(1.246 \pm 0.021) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,醇提含量为 $(1.802 \pm 0.009) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,提示两种提取溶剂均可有效提取ST,醇提溶液中ST含量高于水提( $P < 0.05$ )。

**2.2.3 生白芥子贴膏主要透皮成分指纹图谱** 随着

表1 白芥子水提和醇提连续进样出峰结果(以ST为参照峰)

Tab.1 The results of continuous injection of white mustard seeds with water extraction and alcohol extraction (taking ST as the reference peak)

对象	水提		醇提	
	保留时间(min)	峰面积	保留时间(min)	峰面积
S1	18.863	4 363.805	19.050	8 066.275
S1	18.861	4 427.695	19.037	7 934.266
S1	18.884	4 345.827	19.029	7 989.963
RSD(%)	0.07	0.98	0.06	0.83

注:S1:S1号白芥子水提取液和乙醇提取液;保留时间:ST从进样开始到柱后出现浓度极大值的时间;峰面积:以ST为参照峰,ST峰高与保留时间相乘,面积越大,含量越高。

Note: S1: S1 white mustard water extract and ethanol extract; retention time: ST represents the time from the start of injection to the time when the maximum concentration occurs after the column; peak area: Taking ST as the reference peak, ST peak height multiplied by retention time, the larger the area, the higher the content.

表2 白芥子水提和醇提样品放置不同时间出峰结果(以ST为参照峰)

Tab.2 The results of water extraction and alcohol extraction of white mustard seeds at different times (taking ST as the reference peak)

时间	水提		醇提	
	保留时间(min)	峰面积	保留时间(min)	峰面积
0 h	18.845	586 297	19.011	1 072 781
3 h	18.845	574 237	19.018	1 065 861
6 h	18.882	578 825	19.031	1 067 442
9 h	18.877	580 326	19.018	1 074 219
12 h	18.836	574 177	19.032	1 015 222
24 h	18.871	558 813	19.042	1 065 490
RSD(%)	0.10	1.62	0.06	2.11

注:保留时间:ST从进样开始到柱后出现浓度极大值的时间;峰面积:以ST为参照峰,ST峰高与保留时间相乘,面积越大,含量越高。

Note: Retention time: Represents the time from the start of injection to the time when the maximum concentration of ST occurs after the column; peak area: Take ST as the reference peak, ST peak height multiplied by retention time, the larger the area, the higher the content.

表3 白芥子水提和醇提样品重复性实验(以ST为参照峰)

Tab.3 Repetitive experiment of white mustard in water and alcohol extraction (taking ST as the reference peak)

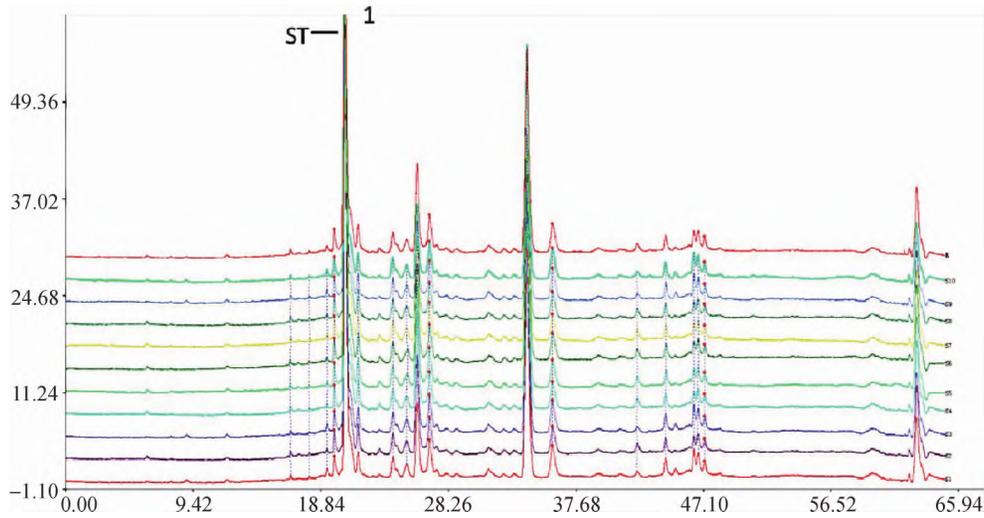
对象	水提		醇提	
	保留时间(min)	峰面积	保留时间(min)	峰面积
S1	18.863	4 363.805	19.011	7 958.653
S2	18.856	4 427.695	19.017	8 002.192
S3	18.861	4 045.823	19.027	8 036.205
S4	18.861	4 323.895	19.05	7 900.276
S5	18.894	4 234.727	19.034	7 889.968
S6	18.869	4 114.811	19.027	7 947.436
S7	18.867	4 035.463	19.09	7 902.685
S8	18.872	4 122.304	19.035	7 919.023
S9	18.887	4 048.394	19.046	8 041.999
S10	18.897	4 155.11	19.09	7 865.49
RSD(%)	0.08	3.40	0.14	0.78

注:S1-S10:S1-S10号白芥子水提取液和乙醇提取液;保留时间:ST从进样开始到柱后出现浓度极大值的时间;峰面积:以ST为参照峰,ST峰高与保留时间相乘,面积越大,含量越高。

Note: S1-S10: S1-S10 white mustard water extract and ethanol extract; retention time: Represents the time from the start of injection to the maximum concentration of ST after the column; Peak area: Taking ST as the reference peak, ST peak height multiplied by retention time, the larger the area, the higher the content.

透皮时间的延长,透皮成分增加,到24 h透过皮肤的主要成分有7种,分别对应白芥子指纹图谱的1、2、3、4、5、6、7号。可以看出,每个时间点均能透过皮肤,而且峰形稳定,峰面积最大的成分为1号峰即ST专属峰。见图3。

**2.3** 各组大鼠贴敷处皮肤内ST透皮率比较 B、D和F组ST透皮率显著高于C和G组,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),H、I组的透皮率差异无统计学意义( $P>0.05$ )。B、D、F和H组ST透皮率均逐渐降低( $P<0.05$ ),C、E、G组ST透皮率均逐渐降低( $P<0.05$ );G、I组之间

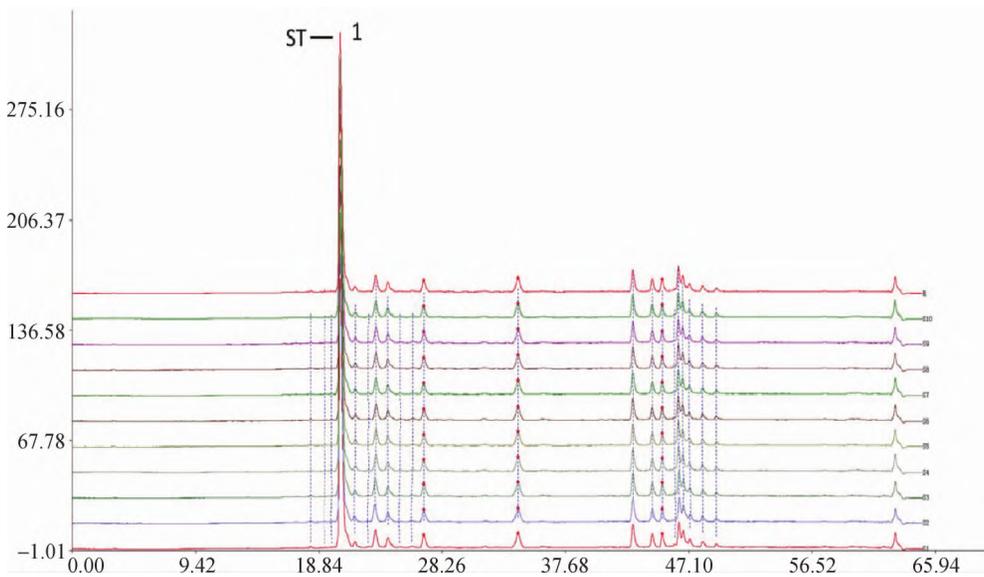


注:横坐标表示保留时间,纵坐标表示紫外吸收值(absorbance,abs)。S1~S10为生白芥子水提指纹图谱,R为对照指纹图谱,1号峰为ST,其峰面积最大,含量最高。

Note: The abscissa represents the retention time, and the ordinate represents the ultraviolet absorption value (absorbance, abs). S1~S10 are the water-extracted fingerprints of raw white mustard seeds, R is the control fingerprint, and peak 1 represents ST, which has the largest peak area and the highest content.

图1 生白芥子水提指纹图谱

Fig.1 Fingerprint of water extraction of raw white mustard seeds



注:横坐标表示保留时间,纵坐标表示紫外吸收值(absorbance,abs)。S1~S10为生白芥子醇提指纹图谱,R为对照指纹图谱,1号峰为ST,其峰面积最大,含量最高。

Note: The abscissa represents the retention time, and the ordinate represents the ultraviolet absorption value (absorbance, abs). S1~S10 are the alcohol-extracted fingerprints of raw white mustard seeds, R is the control fingerprint, and peak 1 represents ST, which has the largest peak area and the highest content.

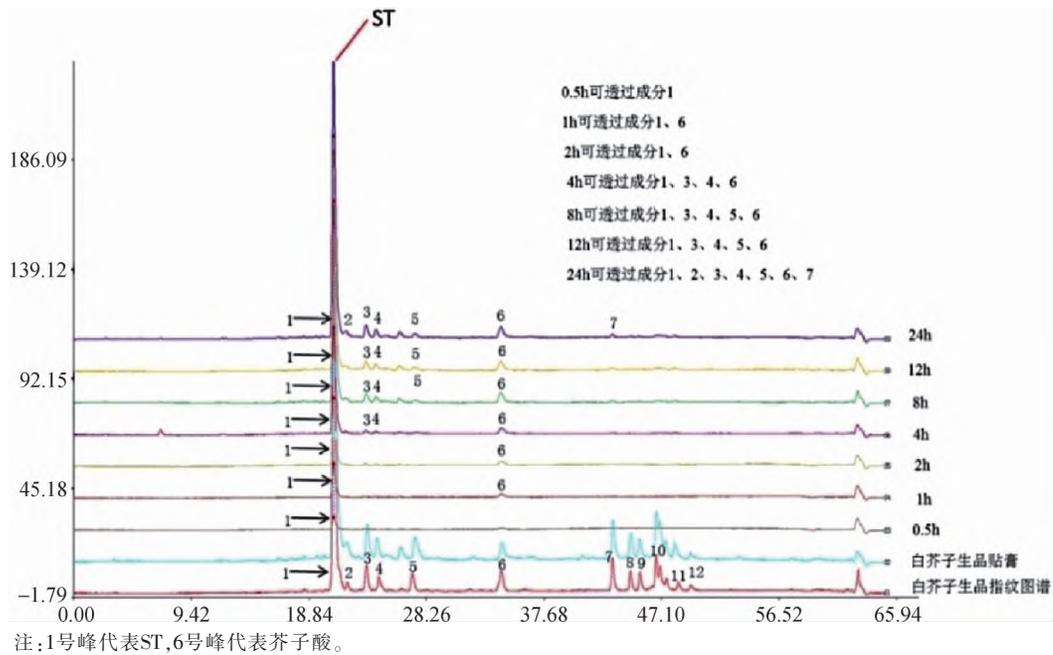
图2 生白芥子醇提指纹图谱

Fig.2 Fingerprint of alcohol extraction of raw white mustard seeds

差异无统计学意义( $P>0.05$ )。各组大鼠肺俞、脾俞与肾俞穴位之间比较,ST透皮率差异无统计学意义( $P>0.05$ )。见表4。说明生白芥子在贴敷处皮肤中的透皮

率高于炒白芥子,而且生/炒白芥子各组肺俞、脾俞、肾俞不同穴位中ST透皮率差异不明显。

2.4 生/炒白芥子贴膏穴位贴敷不同时间点大鼠贴



注:1号峰代表ST,6号峰代表芥子酸。

Note: Peak 1 represents ST, peak 6 represents sinapic acid.

图3 生白芥子贴膏主要透皮成分指纹图谱

Fig.3 Fingerprints of the main transdermal components of the raw white mustard paste

表4 穴位贴敷后各组大鼠皮肤内ST透皮率

Tab.4 The penetration rate of ST in the skin of rats in each group after acupoint application ( $\bar{x} \pm s, \%$ )

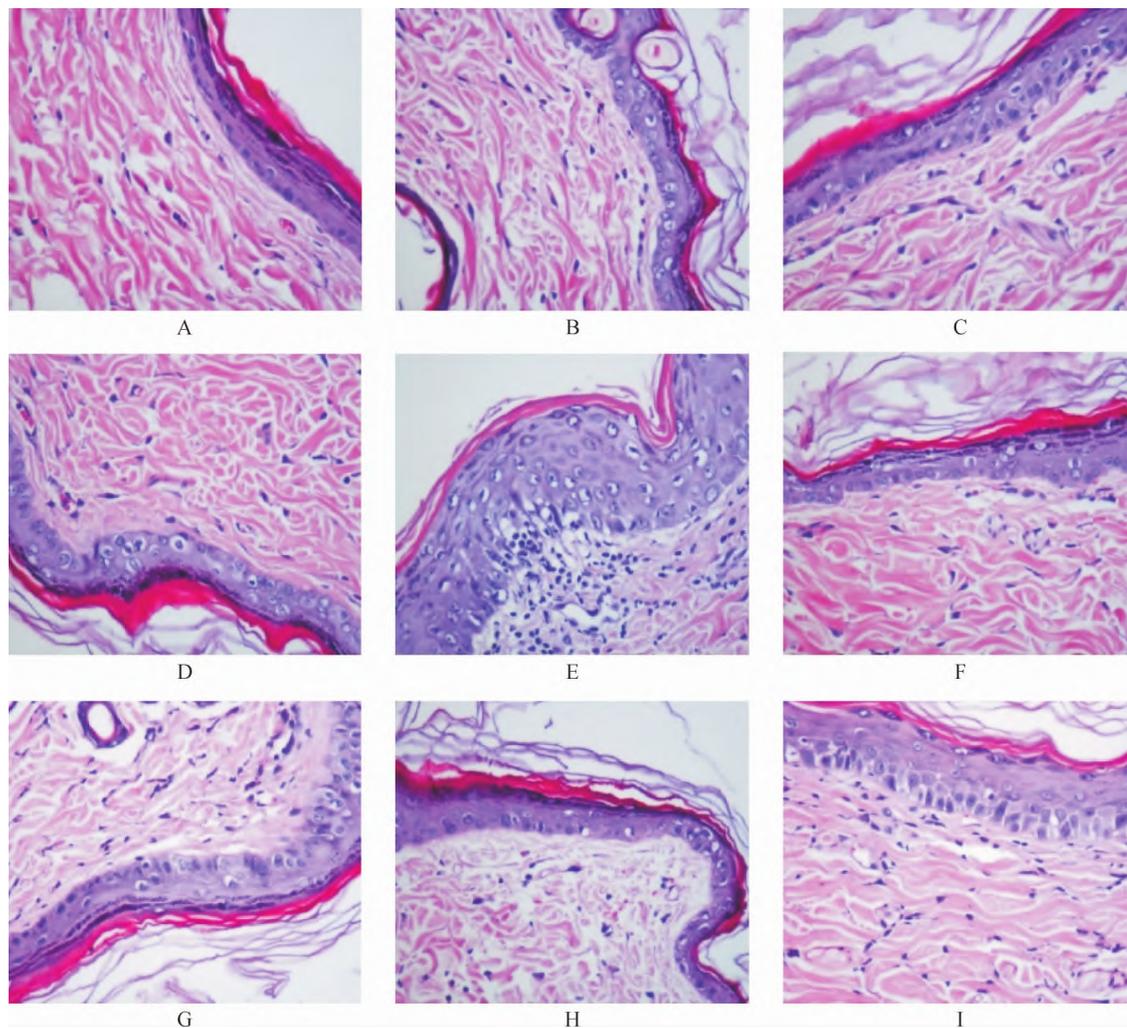
组别		肺俞	脾俞	肾俞
生白芥子贴膏	B组	0.021±0.001	0.021±0.001	0.021±0.001
	D组	0.012±0.001 <sup>#</sup>	0.011±0.001 <sup>#</sup>	0.012±0.001 <sup>#</sup>
	F组	0.010±0.001 <sup>#▲</sup>	0.009±0.001 <sup>#▲</sup>	0.009±0.001 <sup>#▲</sup>
	H组	0.004±0.000 <sup>#▲△</sup>	0.004±0.000 <sup>#▲△</sup>	0.004±0.000 <sup>#▲△</sup>
炒白芥子贴膏	C组	0.020±0.001 <sup>*</sup>	0.018±0.001 <sup>*</sup>	0.017±0.001 <sup>*</sup>
	E组	0.011±0.000 <sup>**</sup>	0.011±0.001 <sup>**</sup>	0.010±0.001 <sup>**</sup>
	G组	0.006±0.000 <sup>**▲</sup>	0.005±0.000 <sup>**▲</sup>	0.005±0.000 <sup>**▲</sup>
	I组	0.004±0.000 <sup>**▲</sup>	0.004±0.000 <sup>**▲</sup>	0.004±0.000 <sup>**▲</sup>

注:与B、D、F、H组比较,<sup>\*</sup>P<0.05;与B、C组比较,<sup>#</sup>P<0.05;与D、E组比较,<sup>▲</sup>P<0.05;与F、G组比较,<sup>△</sup>P<0.05。

Note: Compared with groups B,D,F,H, <sup>\*</sup>P<0.05; compared with groups B,C, <sup>#</sup>P<0.05; compared with groups D,E, <sup>▲</sup>P<0.05; compared with groups F,G, <sup>△</sup>P<0.05.

敷处皮肤结构改变 A组(空白对照)皮肤角质层结构完整,与表皮层紧密相连,各层结构无明显改变。B组(生白芥子贴膏贴敷2 h)和C组(炒白芥子贴膏贴敷2 h)皮肤角质层明显松散,细胞间距明显增加,局部角质层与表皮层分离,角质边缘疏松或脱落明显,角质层变薄,且B组变化较C组明显。D组(生白芥子贴膏贴后2 h)和E组(炒白芥子贴膏贴后2 h)皮肤角质层

松散,角质层与表皮层局部分离,D组较E组明显。F组(生白芥子贴膏贴后4 h)和G组(炒白芥子贴膏贴后4 h)皮肤角质层结构稍紧密,G组较F组紧密。H组(生白芥子贴膏贴后22 h)和I组(炒白芥子贴膏贴后22 h)皮肤角质层较前整齐,细胞间距减小,两组间差异不显著。见图4。



注:A.空白对照组;B.生白芥子贴膏贴敷2 h组;C.生白芥子贴膏贴敷2 h组;D.生白芥子贴膏贴敷4 h组;E.生白芥子贴膏贴敷22 h组;F.炒白芥子贴膏贴敷2 h组;G.炒白芥子贴膏贴敷2 h组;H.炒白芥子贴膏贴敷4 h组;I.炒白芥子贴膏贴敷22 h组。

Note:A. Blank control group; B. Raw white mustard seed plaster applied for 2 h group; C. Raw white mustard seed plaster after application 2 h group; D. Raw white mustard seed plaster after application 4 h group; E. Raw white mustard paste plaster after application 22 h group; F. Fried white mustard seed paste applied for 2 h group; G. Fried white mustard seed plaster after application 2 h group; H. Fried white mustard seed plaster after application 4 h group; I. Fried white mustard seed plaster after application 22 h group.

图4 各组大鼠贴敷处皮肤结构改变情况(HE染色,400×)

Fig.4 Changes of skin structure at the application site of rats in each group (HE staining, 400×)

### 3 讨论

穴位贴敷最早记载可追溯到《五十二病方》,此疗法可以针对不同病症选取不同药物及腧穴配伍,从而发挥扶正祛邪、调和阴阳的作用。研究表明,穴位贴敷对于呼吸道过敏性疾病的防治效果较佳<sup>[11-12]</sup>。很多学者已通过临床及实验研究,对穴位贴敷的免疫调节机制进行了深入的探讨<sup>[13-16]</sup>。然而,穴位贴敷后药物经过皮肤屏障渗透方面的机制研究目前相对欠缺。

皮肤吸收物质的途径包括以下几种:一是经过表皮角质层细胞吸收;二是通过皮肤毛囊、皮脂腺、

汗管等附属器官吸收;三是通过角质层的细胞间隙吸收<sup>[17]</sup>。研究显示,经皮给药后穴位处的皮肤脂质双分子层变得疏松,皮肤角质层细胞脱屑增加,细胞间隙扩大,皮肤通透性增加,从而使药物的经皮吸收增加<sup>[6]</sup>。刘霞等<sup>[18]</sup>对比了穴位与非穴位贴敷处皮肤内芥子碱有效成分的含量,结果显示穴位皮肤中的渗透量和渗透速率均显著高于非穴位皮肤,证明穴位皮肤对经皮给药的药物具有一定的存储性。

本研究首先建立了白芥子HPLC指纹图谱,提示ST出峰明显、峰形理想、峰面积最大,表明ST在白芥

子中含量最高。后续建立了白芥子贴膏给药后不同时间点的经皮渗透指纹图谱,获得给药后0.5、1、2、4、8、12、24 h各时点透皮成分的指纹图谱特征,发现每个时点均能透皮,而且峰面积最大的有效成分为ST。通过LC-MS/MS检测白芥子贴膏中的成分,笔者发现白芥子治疗过敏性鼻炎和哮喘等呼吸道过敏性疾病的有效成分中含量最高的为ST<sup>[9]</sup>,并且证实ST能够在贴敷处皮肤中长期滞留,以刺激穴位发挥作用。

生白芥子经过炮制后,其有效成分及含量可能发生改变,贴敷的疗效与炮制前亦存在差异。研究显示,生白芥子贴膏治疗过敏性鼻炎及哮喘的疗效优于炒白芥子贴膏和生/炒各半贴膏<sup>[9]</sup>。也有学者认为,生白芥子贴膏、生/炒各半贴膏和炒白芥子贴膏治疗哮喘疗效无显著差异<sup>[20]</sup>。前期研究发现,生白芥子贴膏穴位贴敷大鼠背部肺俞、脾俞、肾俞,治疗过敏性鼻炎的疗效优于炒白芥子贴膏<sup>[9]</sup>。为了研究白芥子贴膏透皮的相关机制,本研究检测了贴敷后大鼠皮肤中ST的含量,并计算其透皮率,结果显示生白芥子贴膏贴敷2 h、贴后2、4 h各穴位中的ST透皮率均明显高于炒白芥子组,其原因可能为:(1)经过炒制后白芥子ST含量显著下降;(2)生白芥子贴膏对于皮肤的刺激性更强,使皮肤角质层结构变得更加疏松,更有利于ST的透皮吸收。

为了研究生/炒白芥子贴膏穴位贴敷后大鼠皮肤结构的变化,进一步对贴敷处皮肤进行HE染色,结果显示贴敷后大鼠皮肤组织结构较空白对照疏松,生白芥子贴膏组较炒白芥子贴膏组疏松更加明显,其中贴敷2 h组皮肤结构松散最明显,贴后4 h皮肤开始逐渐恢复,贴后22 h皮肤结构较整齐。以上说明穴位贴敷后大鼠皮肤结构改变,角质层脱落,细胞间隙增加,这样有利于药物经皮渗透。生白芥子贴膏在皮肤中的滞留量多于炒白芥子贴膏,从而能够更好地发挥治疗作用。在生/炒白芥子贴膏撕去后4 h,大鼠皮肤结构开始逐渐恢复,撕去后22 h大鼠皮肤逐渐恢复至接近空白对照,说明在生/炒白芥子贴膏刺激去除后22 h,皮肤屏障可能通过自我修复以恢复正常结构。

本研究的不足之处有以下几方面。第一,本研究选取的贴膏沿用《张氏医通》中的哮喘方,为混合膏剂,除了白芥子外还有其他3味药物,其他药物是否对白芥子有效成分的透皮作用存在影响尚不明确,后续研究可分别将哮喘方中的各味药物制成贴

膏,并研究各自有效成分的透皮作用;第二,既往已有对不同配比的生/炒白芥子贴膏疗效的比较,本研究只探讨了单纯的生白芥子贴膏与单纯的炒白芥子贴膏之间的差异,后续可以制备生/炒白芥子含量1:1、1:2或2:1等不同配比的白芥子贴膏,并可将皮肤反应一并纳入研究,从而优化贴敷药物比例,提高患者的依从性。

#### 参考文献:

#### References:

- [1] 胡奇妙,谷鹏鹏,姜霞,等.不同强度穴位贴敷治疗中重度持续性过敏性鼻炎:随机对照研究[J].中国针灸,2017,37(11):1177-1182.  
HU Qimiao, GU Pengpeng, JIANG Xia, et al. Moderate and severe persistent allergic rhinitis treated with acupoint application therapy of the different intensity: a randomized controlled trial[J]. Chin Acup Moxib, 2017, 37(11):1177-1182.
- [2] 时宽,吴文忠,刘兰英,等.基于正交设计法优化穴位贴敷防治支气管哮喘方案的研究[J].中国针灸,2017,37(6):571-575.  
SHI Kuan, WU Wenzhong, LIU Lanying, et al. Optimization of acupoint application scheme in the treatment of bronchial asthma based on the orthogonal design method[J]. Chin Acup Moxib, 2017, 37(6):571-575.
- [3] 崔淑华,李娜,邢燕军,等.白芥子不同配比穴位贴敷对支气管哮喘患者免疫球蛋白及嗜酸粒细胞的影响[J].中医杂志,2015,55(11):935-938.  
CUI Shuhua, LI Na, XING Yanjun, et al. Effects of acupoint application of mustard seeds with different proportions on immunoglobulins and eosinophils in bronchial asthma patients[J]. J Tradit Chin Med, 2015, 55(11):935-938.
- [4] JIN Y T, CHEN S, ZHU Z Y, et al. TLR-NF- $\kappa$ B signaling pathway-based investigation on the influence of acupoint application of raw and fried white mustard seed plasters on nasal mucosa in rats with allergic rhinitis[J]. Acta Medica Mediterr, 2018, 34(5):1461-1467.
- [5] CHEN S, JIN Y T, ZHU Z Y, et al. *In vivo* study on site of action of sinapine thiocyanate following acupoint herbal patching [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2018, 2018:9502902.
- [6] 马晓莉,曹松云,仇金龙,等.大蒜硝磺膏中芒硝体外经皮渗透实验研究[J].中成药,2014,36(7):1542-1545.  
MA Xiaoli, CAO Songyun, QIU Jinlong, et al. Experimental study on *in vitro* percutaneous penetration of mirabilite in garlic nitre yellow paste[J]. Chin Tradit Pat Med, 2014, 36(7):1542-1545.
- [7] 苏慧,岳琳,刘颖,等.芥子及莱菔子饮片炮制前后物质基础变化规律分析[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(7):23-26.  
SU Hui, YUE Lin, LIU Ying, et al. Analysis on change law of material basis of sinapis semen and

- raphani semen before and after processing[J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2018, 24(7):23-26.
- [8] 李忠仁. 实验针灸学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2007: 301-307.
- LI Zhongren. *Experimental Acupuncture and Moxibustion* [M]. Beijing: China Traditional Chinese Medicine Press, 2007:301-307.
- [9] 郭义, 方剑乔. 实验针灸学实验指导[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2012:54-57.
- GUO Yi, FANG Jianqiao. *Experimental Acupuncture and Moxibustion Experiment Guide* [M]. Beijing: China Traditional Chinese Medicine Press, 2012:54-57.
- [10] 赵金茹, 孙宏伟. 基础医学实验基本技能[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2009:125-130.
- ZHAO Jinru, SUN Hongwei. *Basic Medical Experiment Basic Skills* [M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2009:125-130.
- [11] XIANG S J, LI M H, CHAN C O, et al. Altered metabolites in guinea pigs with allergic asthma after acupoint sticking therapy: new insights from a metabolomics approach[J]. *Phytomedicine*, 2019, 54:182-194.
- [12] 严守莲. 射干麻黄汤联合穴位贴敷治疗支气管哮喘(痰饮郁肺)随机平行对照研究[J]. 实用中医内科杂志, 2018, 32(2):50-53.
- YAN Shoulian. Shegan Mahuang Decoction combined with acupoint application in treating bronchial asthma (Tanyin Yufei) randomized controlled study[J]. *Pract Tradit Chin Intern Med*, 2018, 32(2):50-53.
- [13] AUSTIN P J, TSITSIOU E, BOARDMAN C, et al. Transcriptional profiling identifies the long noncoding RNA plasmacytoma variant translocation(PVT1) as a novel regulator of the asthmatic phenotype in human airway smooth muscle[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2017, 139(3): 780-789.
- [14] TU W Z, CHEN X L, WU Q Y, et al. Acupoint application inhibits nerve growth factor and attenuates allergic inflammation in allergic rhinitis model rats[J]. *J Inflammation*, 2020, 17(4):1-10.
- [15] JIN Y T, ZHU Z Y, WU L T, et al. Effect of acupoint application on TLR-NF- $\kappa$ B pathway in nasal mucosa of rats with allergic rhinitis[J]. *J Tradit Chin Med*, 2018, 59(12):1054-1057.
- [16] 金禹彤, 宣丽华. 白芥子贴膏穴位贴敷对过敏性鼻炎大鼠的免疫调制作用研究[J]. 浙江中医药大学学报, 2020, 44(12):1165-1171.
- JIN Yutong, XUAN Lihua. Immunomodulation of acupoint application with semen sinapis plaster on rats with allergic rhinitis[J]. *J Zhejiang Chin Med Univ*, 2020, 44(12):1165-1171.
- [17] PRAUSNITZ M R, MITRAGOTRI S, LANGER R. Current status and future potential of transdermal drug delivery[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2004, 3(2):115-124.
- [18] 刘霞, 郭秀彩, 林媛媛, 等. 穴位与非穴位皮肤生物物理学性质影响芥子碱渗透特性研究[J]. 中草药, 2013, 44(9):1111-1116.
- LIU Xia, GUO Xiucui, LIN Yuanyuan, et al. Effects of dermal biophysical characteristics of acupoint and non-acupoint on permeability of sinapine[J]. *Chin Tradit Herbal Drugs*, 2013, 44(9):1111-1116.
- [19] 赵国静, 胡海波, 周兆山. 三伏贴治疗支气管哮喘的临床研究[J]. 山东中医杂志, 2016, 35(7):601-604.
- ZHAO Guojing, HU Haibo, ZHOU Zhaoshan. Clinical study on effect of sanfu patches in treating asthma[J]. *Shandong J Tradit Chin Med*, 2016, 35(7):601-604.
- [20] 崔淑华, 李娜, 邢燕君, 等. 白芥子不同配比穴位贴敷防治支气管哮喘的皮肤反应及疗效分析[J]. 辽宁中医杂志, 2014, 41(12):2636-2638.
- CUI Shuhua, LI Na, XING Yanjun, et al. Analysis of skin reactions and efficacy of preventing and treating bronchial asthma by acupoint application therapy with different dose ratio of Semen Sinapis[J]. *Liaoning J Tradit Chin Med*, 2014, 41(12):2636-2638.

(收稿日期:2021-10-05)