

微透析联用高效液相色谱法研究青藤碱 雷公藤甲素巴布剂的裸鼠在体透皮吸收过程

邓亚利¹,周莉玲^{2*}

(1. 华南农业大学制药工程系,广州 510642; 2. 广州中医药大学,广州 510405)

[摘要] 目的:研究一种青藤碱雷公藤甲素巴布剂裸鼠透皮吸收过程。方法:采用微透析联用 HPLC 的方法,以 30% 乙醇/生理盐水为灌流液,样品以 Diamonsil-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 为色谱柱,以甲醇-磷酸盐缓冲液 (pH 9.0) (55:45) 为流动相,检测波长为 225 nm 的条件下进行分析,经过反透析法体内回收率校正后,所得的裸鼠皮下游离青藤碱雷公藤甲素浓度采用 WINNONLIN 5.2 程序以非房室模型方法计算药代动力学参数。结果:青藤碱达峰时间为 14 h,达峰浓度为 30.15 μg·mL⁻¹。雷公藤甲素达峰时间为 10 h,达峰浓度为 3.31 μg·mL⁻¹。结论:本方法能够在体、实时监测裸鼠皮下青藤碱雷公藤甲素的动态浓度,为局部药动学研究提供新的方法学参考。

[关键词] 青藤碱;雷公藤甲素;微透析;药动学;高效液相色谱法

[中图分类号] R285.5;R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2010)17-0118-04

Transdermal Delivery of Sinomenine and Triptolide Across Nude Mouse Skin *in vivo* by HPLC Combined with Microdialysis

DENG Ya-li¹, ZHOU Li-ling^{2*}

(1. *Pharmaceutics Engineering Department, South China Agriculture University, Guangzhou 510642, China;*

2. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

[Abstract] **Objective:** To determine the concentration of sinomenine and triptolide in nude mouse hypodermis. **Method:** Microdialysis coupled with high-performance liquid chromatography was developed for on-line determination of the *in vivo* concentration of sample, when the perfusate was 30% ethanol/physiological saline solution. The Diamonsil-C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was used and the mobile phase consisted of methanol:buffer phosphate (pH 9.0) (55:45). The detect wave length was 225 nm. The data obtained after being calculated using the relative recovery *in vivo* were dealt with WINNONLIN 5.2 programe, while retro-dialysis method was used to study relative recovery *in vivo*. **Result:** The peak time of sinomenine and triptolide were 14 h and 10 h, peak concentrations were 30.15 μg·mL⁻¹ and 3.31 μg·mL⁻¹ respectively. **Conclusion:** The method can be used to determine *in vivo* and real time concentration of sinomenine and triptolide in the skin dynamically. It is suitable for the pharmacokinetics study of sinomenine and triptolide at the same time.

[Key words] sinomenine; triptolide; microdialysis; pharmacokinetics; HPLC

[收稿日期] 20100514(001)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30672669)

[第一作者] 邓亚利,博士,副主任药师,主要从事药物新剂型及新技术研究, Tel: 020-38297109, E-mail: xiyuandeng@scau.edu.cn

[通讯作者] *周莉玲,教授,博士生导师, Tel: 020-39358040, E-mail: zhouliling717@sina.com

青藤碱(sinomenine)为防己科植物青风藤的主要有效成分;雷公藤甲素(triptolide)是卫矛科植物雷公藤治疗类风湿性关节炎等疾病的主要有效成分,临床上常将两者联合,在关节等部位外用给药,以增强疗效降低毒副作用。本研究拟利用微透析^[1-4]联用高效液相色谱检测青藤碱雷公藤甲素巴

布剂 (STP) 在裸鼠皮肤局部吸收的情况^[5-6], 为 2 者联合用药或组成复方提供依据。

1 材料

1.1 药品与试剂 青藤碱对照品 (供含量测定用, 中国药品生物制品检定所, 批号 0774-200105); 雷公藤甲素对照品 (供含量测定用, 中国药品生物制品检定所, 批号 111567-200502); 青藤碱雷公藤甲素巴布剂由本室自制; 甲醇为色谱纯, 其余试剂均为分析纯。灌流液为人工细胞外液 (Krebs-Ringer 溶液, 临用前配制。组成: NaCl 122 mmol·L⁻¹, KCl 3 mmol·L⁻¹, MgSO₄ 1.2 mmol·L⁻¹, KH₂PO₄ 0.4 mmol·L⁻¹, NaHCO₃ 25 mmol·L⁻¹, CaCl₂ 1.2 mmol·L⁻¹)。

1.2 动物 BALB/C 裸鼠, 雄性 4 周龄, 广州中医药大学试验动物中心提供, 合格证号 0028166。

1.3 仪器及色谱分析系统 微透析系统 (美国 BAS 公司, 包括: 线性探针 (MD2005), 外径 320 μm, 活性透析膜长度为 10 mm; 灌注器推进泵 (MD1001); 灌注器 (MD-0100); 灌注器支架 (MD1002); 流速控制器 (MD1000)。Summit P680 型高效液相色谱仪 (德国 Dionex 公司, 由 PDA-400 型二级管阵列检测器, ASI-100 型自动进样器, Summit 恒温箱和 Chromecion 色谱工作站组成); Diamonsil-C₁₈ (美国菲罗门公司 4.6 mm × 250 mm 5 μm); 以甲醇-磷酸盐缓冲液 (0.005 mol·L⁻¹ 磷酸氢二钠溶液, 以 0.005 mol·L⁻¹ 的磷酸二氢钠调节 pH 至 8.0, 再以 1% 三乙胺调节 pH 至 9.0 55:45) 为流动相^[7]; 检测波长 225 nm。理论板数按青藤碱峰计算应不低于 1 500。

2 方法

2.1 2 种灌流液的体外相对回收率测定 分别以 Krebs-Ringer 溶液、30% 乙醇/生理盐水为灌流液, 采用增量法测定探针的体外回收率 (RR), 其回收率为透析液峰面积积分值与灌流液峰面积积分值之百分比。

将探针浸入含青藤碱雷公藤甲素的灌流液中, 并用不含青藤碱雷公藤甲素的灌流液灌注探针, 流速分别为 4, 2, 1, 0.5, 0.2 μL·min⁻¹, 收集 4 次微透析液样品, 样品量 20 μL, 收集时间分别为 5, 10, 20, 40, 100 min。测定青藤碱雷公藤甲素的浓度, 进样量 10 μL。同时精密吸取含青藤碱雷公藤甲素的灌流液 (青藤碱 0.280 g·L⁻¹; 雷公藤甲素 39.6 mg·L⁻¹) 30 μL, 与样品同法操作, 测定灌流液中青藤碱雷公藤甲素浓度。

2.2 体内测定青藤碱雷公藤甲素的经皮吸收动力学过程 裸鼠 ip 戊巴比妥溶液 (0.06 mL·g⁻¹) 麻醉, 清洁背部皮肤, 然后栓住其四肢, 使其背部朝上固定于操作架上。在裸鼠背部靠中央的位置, 植入一根线性微透析探针。以 30% 乙醇/生理盐水为灌流液, 以 0.5 μL·min⁻¹ 的流速灌流 1.5 h 左右, 以使局部血流量恢复正常, 并待裸鼠苏醒。将 STP 贴于探针通过部位的皮肤表面, 同时开始收集探针流出的透析液。收集过程中保持裸鼠清醒状态, 维持灌流液流速 0.5 μL·min⁻¹, 取样时间间隔为 30 min, 每次收集量为 15 μL, 总收集时间在 20 h 以上。

取样结束后, 再将灌流液换成含较高浓度青藤碱雷公藤甲素的 30% 乙醇/生理盐水溶液 (青藤碱 0.28 g·L⁻¹; 雷公藤甲素 39.6 mg·L⁻¹) 以相同的流速灌流探针, 稳定灌流 30 min 后, 开始收集透析液, 共收集 5 个点, 此部分透析液用于计算探针的体内回收率。

透析液样品中药物的浓度利用 HPLC 外标一点法测定, 然后根据探针的体内回收率按公式求得皮肤药物浓度值 (皮肤药物浓度 = 透析药物浓度 / 探针体内回收率, $C_{\text{ECF}} = C_{\text{dialysate}} / R$)。用 WINNONLIN 5.2 程序以非房室模型方法计算药代动力学参数^[8-9]。

3 结果

3.1 青藤碱雷公藤甲素色谱条件考察结果

3.1.1 透析样品的分离 在所建立的液相色谱条件下, 体内外透析样品青藤碱雷公藤甲素得到了很好地分离, 无干扰, 体内透析样品的色谱图如图 1 所示。

3.1.2 标准曲线 精密称取青藤碱对照品、雷公藤甲素对照品适量, 加甲醇制成每 1 mL 含青藤碱 0.235 2 mg, 含雷公藤甲素 40.512 μg 的溶液, 摇匀, 即得对照品储备溶液。精密吸取对照品储备溶液 1 mL, 置于 25 mL 量瓶中, 甲醇定容, 得青藤碱 (9.41 μg·mL⁻¹) 与雷公藤甲素对照品溶液 (1.62 μg·mL⁻¹)。将此溶液分别进样 1, 2, 4, 6, 8, 10 μL; 对照品储备液分别进样 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10 μL。分别以浓度 (X) 和相应峰面积 (Y) 进行线性回归, 得到青藤碱的标准曲线方程为 $Y = 0.0281X - 0.0205$, $R = 0.9998$, 与 $Y = 35.142X - 0.1393$, $R = 0.9994$, 则青藤碱含量在 9.41 ~ 94.08 ng 与 0.12 ~ 2.35 mg, 线性关系良好; 雷公藤甲素的标准曲线方程为 $Y =$

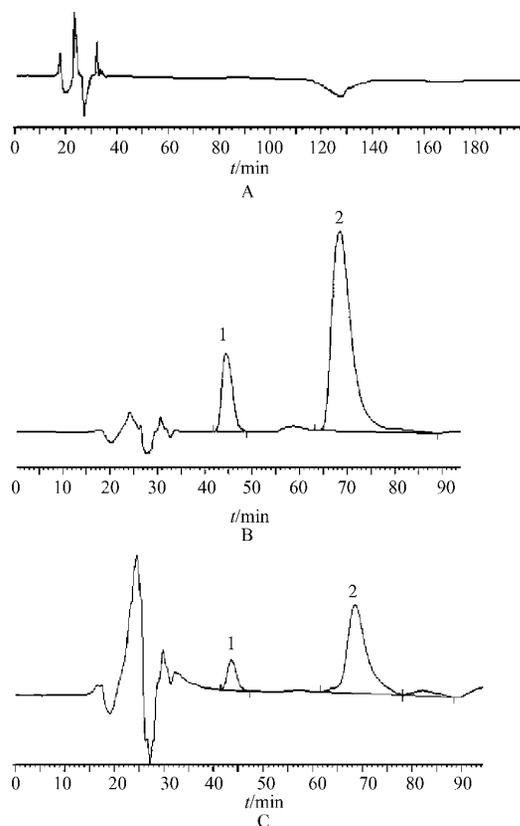


图 1 青藤碱雷公藤甲素 HPLC 色谱
A. 空白溶液; B. 对照品; C. 样品
1. 雷公藤甲素; 2. 青藤碱

0.048 7X - 0.013 5, R = 0.999 5, 与 Y = 0.036 9X + 0.035 6, R = 0.999 9; 雷公藤甲素含量在 3.24 ~ 16.20 ng 与 20.26 ~ 405.12 ng 线性关系良好。

3.1.3 精密度试验 取青藤碱浓度为 9.41 μg·mL⁻¹, 雷公藤甲素质量浓度为 1.62 mg·L⁻¹ 的对照品溶液, 分别自动进样 10.5 μL, 重复 6 次, 青藤碱峰面积的 RSD 1.04% 与 1.86%, 雷公藤甲素峰面积 RSD 1.22% 与 1.88%。

3.1.4 稳定性试验 取精密度试验同样条件的对照品溶液, 每隔 2 h 进样 1 次, 8 h 内 4 次测定结果的峰面积基本保持不变, 青藤碱峰面积的 RSD 1.56%, 雷公藤甲素峰面积的 RSD 1.97%。

3.1.5 最低检测限测定 按信噪比等于 3 (S/N = 3) 作为最低检测限, 测得雷公藤甲素的最低检测限为 1.62 ng; 青藤碱的最低检测线为 9.41 ng。

3.2 探针体外回收率试验结果 分别以 Krebs-Ringer 溶液、30% 乙醇/生理盐水为灌流液, 青藤碱、雷公藤甲素的体外回收率与流速呈反指数关系, 当流速为 0.5 μL·min⁻¹ 时, 两者的平均回收率分别为

32.05%、66.12% 与 15.12%、62.86%。30% 乙醇/生理盐水为灌流液探针的相对回收率较高, 特别是极性小的雷公藤甲素。故在皮肤局部药动学研究中选用 30% 乙醇/生理盐水为灌流液。

3.3 探针体内回收率试验结果 体内试验中用反向透析法在试验后测定探针的回收率。可直接按峰面积积分值进行计算:

$$R = \frac{\text{灌流液峰面积积分值} - \text{透析液峰面积积分值}}{\text{灌流液峰面积积分值}} \times 100\%$$

100%

结果表明探针体内回收率在各次试验间较为稳定, 青藤碱和雷公藤甲素的体内回收率分别为 32.36% (RSD 4.52%, n = 8) 和 29.55% (RSD 4.91%, n = 8)。

3.4 青藤碱雷公藤甲素的经皮吸收动力学过程 将所测得的青藤碱及雷公藤甲素浓度-时间数据, 用 WINNONLIN 5.2 程序以非房室模型方法计算药代动力学参数, C_{max} 和 T_{max} 为实测值, AUC_{0-t} 和 AUC_{0-∞} 通过实测血药浓度经梯形积分法估算。经皮吸收动力学过程见图 2, 3, 药代动力学参数见表 1。

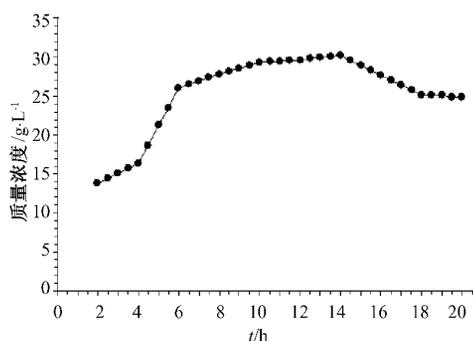


图 2 青藤碱经皮吸收浓度-时间曲线

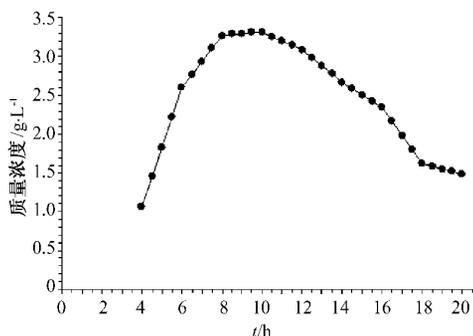


图 3 雷公藤甲素经皮吸收浓度-时间曲线

表 1 青藤碱和雷公藤甲素经皮吸收动力学参数

参数	青藤碱	雷公藤甲素
$T_{1/2}/h$	19.82	15.88
T_{max}/h	14.00	10.00
$C_{max}/mg \cdot L^{-1}$	30.15	3.31
$AUC_{0-1}/\mu g \cdot h^{-1} \cdot mL^{-1}$	476.43	42.45
MRT_{0-1}/h	11.26	11.16
$MRT_{0-\infty}/h$	33.58	25.25

4 讨论

4.1 含量测定方法学考察 对青藤碱、雷公藤甲素进行波谱扫描,青藤碱在 265 nm 处有最大吸收;雷公藤甲素在 218 nm,225 nm 处有吸收;复方组成中青藤碱的用量远远大于雷公藤甲素用量,故选择雷公藤甲素有最大吸收的波长 225 nm 为检测波长。线性有高浓度线性和低浓度线性,高浓度线性用于体外释放度的测定。

4.2 关于灌流液的选择 灌流液通常是与细胞间液非常相近的生理溶液,少数加以改进的灌流液含有不同的添加剂,但仍以水性液为主。选择水性灌流液的目的是为了保证在不干扰体内正常生命过程的情况下进行活体取样。而在经皮给药制剂中,大多数的药物亲脂性较强,在水性灌流液中溶解度低,从而导致亲脂性化合物探针回收率很低。STP 中雷公藤甲素的含量相对于青藤碱较少,而雷公藤甲素在 Krebs-Ringer 溶液中的浓度极低,而且微透析的样品量少,探针回收率低。改用溶解度较高的 30% 乙醇/生理盐水作为灌流液后,探针的体外、体内回收率均提高。在体试验时,30% 乙醇/生理盐水可能会改变探针附近的细胞外液性质,从而影响药物的分布规律。青藤碱采用 30% 乙醇/生理盐水为灌流液,与以 Krebs-Ringer 溶液为灌流液相比,透皮速率常数有很大提高。

4.3 关于 STP 药物动力学 青藤碱、雷公藤甲素在体内先后达到峰浓度,两者达峰时间相差 4 h,提示两种成分以一定比例入药,但因体内药物代谢动力学的差异,在不同的时间段,发挥主要疗效的药物成分不同,雷公藤甲素先达峰,发挥药效,并在体内维持一段时间的浓度,与青藤碱一同发挥药效,产

生协同作用;两者的平均滞留时间分别为 33.58 h 和 25.25 h,为两者联合用药提供依据。

本文采用皮肤内微透析技术与 HPLC 分析方法相结合,研究青藤碱雷公藤甲素组成复方制成巴布剂后,其经皮吸收过程,为两者联合用药提供药物代谢动力学方面的依据。本方法灵敏准确,能够在体、实时监测裸鼠皮下青藤碱雷公藤甲素的浓度。

[参考文献]

- [1] Funan Chen, Zhujun Zhang, Yingxue Zhang, et al. Microdialysis sampling and high-performance liquid chromatography with chemiluminescence detection for in-vivo on-line determination and study of the pharmacokinetics of levodopa in blood [J]. Anal Bio Chem, 2005, 382(1): 211.
- [2] Lin L C, Chen Y F, Lee W C, et al. Pharmacokinetics of gastrodin and its metabolite p-hydroxybenzyl alcohol in rat blood, brain and bile by microdialysis coupled to LC-MS/MS [J]. J Pharm Biomed Anal, 2008, 48(3): 909.
- [3] 吕允凤,胡欣,毕开顺.应用微透析技术和质谱法测定川芎嗪对大鼠脑内乙酰胆碱释放量的影响[J].药学学报,2008,43(11):1128.
- [4] 张英丰,周莉玲,汪小根,等.青藤碱微透析体外回收率的测定及影响因素的研究[J].中药材,2005,28(12):1064.
- [5] 凌家俊,王岩,谢波,等.利用微透析技术进行青藤碱贴剂的生物等效性研究[J].中国中药杂志,2008,33(21):2482.
- [6] 隗慧林,徐兰芳,郑家润,等.反向透析法用于体内经皮吸收微透析探针回收率的测定[J].中国新药杂志,2007,16(13):1024.
- [7] 中国药典.一部[S].2005:135.
- [8] 王丹,石力夫,胡晋红,等.微透析联用反相高效液相色谱对大鼠皮肤葛根素的药代动力学研究[J].分析化学,2008,36(10):1391.
- [9] Shinkai N, Korenaga K, Takizawa H. Percutaneous penetration of felbinac after application of transdermal patches: relationship with pharmacological effects in rats [J]. Pharm Pharmacol, 2008, 60(1): 71.

[责任编辑 聂淑琴]