

大鼠口服菊花提取物后血浆中木犀草素及芹菜素测定方法的研究

潘兰英, 李丽萍, 蒋惠娣* (浙江大学药学院药物分析与药物代谢研究室, 杭州 310031)

摘要: 目的 建立大鼠血浆中木犀草素和芹菜素总浓度的 HPLC 测定方法, 并研究大鼠口服菊花提取物 (CME) 后其效应成分——木犀草素、芹菜素的药动学参数。方法 大鼠血浆在 $2.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸酸性条件下于 80°C 水浴水解 1.5 h, 水解液经乙酸乙酯萃取, 萃取液减压抽干后溶解, 经 HPLC 分析。采用 $\text{Dimonsil ODS C}_{18}$ 色谱柱, 以 甲醇-0.2% 磷酸 (55:45) 为流动相, 流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 检测波长 350 nm , 柱温 30°C 。应用建立的方法测定大鼠口服 $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 菊花提取物后血浆中木犀草素及芹菜素质量浓度, 并以 3P87 软件计算其药动学参数。结果 本法木犀草素和芹菜素的定量下限 (LOQ) 分别为 0.0455 和 $0.145 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 两者分别在 $0.0455 \sim 8.09$ 和 $0.145 \sim 25.7 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 内呈良好线性关系, r 分别为 0.9957 及 0.9974 两者低、中、高质量浓度的绝对回收率及方法回收率均在 $89\% \sim 107\%$ 内。日间及日内精密度 RSD 均小于 $<1\%$ 。大鼠口服 CME 后木犀草素与芹菜素的 K_a 分别为 1.72 和 0.237 h ; $t_{1/2}$ (K_a) 分别为 0.440 和 3.21 h ; $t_{1/2\beta}$ 分别为 0.774 和 4.82 h ; $t_{1/2\beta}$ 分别为 6.64 和 8.65 h ; t_{max} 分别为 0.730 和 2.91 h ; ρ_{max} 分别为 2.43 和 $9.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; AUC 分别为 21.40 和 $143 \text{ mg} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$ 。结论 本研究建立的方法准确可靠, 操作简便重复性好, 适用于测定血浆中木犀草素及芹菜素浓度。

关键词: 菊花提取物; 高效液相色谱法; 木犀草素; 芹菜素; 药动学

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 1001-2494(2007)05-0374-05

Development of RP-HPLC Assay for Determination of Total Luteolin and Apigenin in Plasma and Its Application to Pharmacokinetics After Single Oral Dose of *Chrysanthemum morfolium* Extract in Rats

PAN Lan-ying LIL i-ping JIANG Hui-di* (Department of Pharmaceutical Analysis and Drug Metabolism, College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310031, China)

ABSTRACT: **OBJECTIVE** To establish a RP-HPLC method for the determination of total luteolin and apigenin in rat plasma after acid hydrolysis and to apply the method for pharmacokinetics study after a single dose of *Chrysanthemum morfolium* extract (CME) in rats. **METHODS** The samples were hydrolyzed with $2.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ hydrochloric acid ($c = 2.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) at 80°C water bath for 1.5 h, then the solution were extracted with ethylacetate. The organic layer separated was blown to dry and dissolved reconstituted in the mobile phase. The HPLC separation was performed on a C_{18} column and the UV detector wavelength was set at 350 nm . The plasma samples were analyzed after an oral administration of CME to rat ($200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) by the developed method. The pharmacokinetic parameters were evaluated by 3P87 software. **RESULTS** Good linearities of luteolin and apigenin were obtained over the range of $0.0455 \sim 8.09 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, and $0.145 \sim 25.7 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ in plasma respectively. The recoveries of luteolin and apigenin were from 89% to 107% . The precisions of intra-day and inter-day were all less than 1% . The main pharmacokinetics parameters were as follows: k_a of luteolin and apigenin was 1.72 and 0.237 h^{-1} ; $t_{1/2}$ (k_a) 0.440 and 3.21 h ; $t_{1/2\alpha}$ 0.774 and 4.82 h ; $t_{1/2\beta}$ 9.88 and 8.65 h respectively; t_{max} was 0.730 and 2.91 h ; ρ_{max} 2.43 and $9.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; AUC 21.04 and $143 \text{ mg} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$. **CONCLUSION** The method developed is sensitive, accurate and reproducible, and can be applied to the determination of luteolin and apigenin in plasma.

KEY WORDS *Chrysanthemum morfolium* extract; HPLC; luteolin; apigenin; pharmacokinetics

传统中药菊花 (*Flos Chrysanthemi*) 含木犀草素-7- β -D-葡萄糖苷、芹菜素-7- β -D-葡萄糖苷等多种黄酮类化合物^[1], 具有“清热散风、平肝明目”等功能。其中木犀草素及其苷具有抗菌、抗炎、抗病毒、抗肿瘤及扩张血管等药理作用^[2-3]。而本研究室的研

已经证明^[4], 动物口服菊花提取物 (*Chrysanthemum morfolium* extract, CME) 后可在血浆中检测到木犀草素、芹菜素, 且但检测不到上述两种黄酮苷。并且将 CME 与肠道微生物培养后发现, 提取物中的木犀草素-7- β -D-葡萄糖苷、芹菜素-7- β -D-葡萄糖苷可以

基金项目: 浙江省自然科学基金 (Y204379); 浙江省科技厅重点项目 (G20020578)

作者简介: 潘兰英, 女, 硕士 * 通讯作者: 蒋惠娣, 女, 教授 Tel: (0571) 87217226 E-mail: huijiang@zju.edu.cn

迅速转变为木犀草素和芹菜素。许多研究表明,黄酮类在肝脏二相代谢酶的作用下,可发生葡萄糖醛酸化和硫酸化反应,因此木犀草素和芹菜素在血浆中有部分以葡萄糖醛酸结合物和硫酸结合物存在。我们的研究表明,在家兔血浆不存在这两种结合物,我们曾分析了家兔口服 CME 及 CME 水解产物后血浆中游离的木犀草素及芹菜素^[5]。考虑到在动物体内木犀草素和芹菜素可经二相代谢生成葡萄糖醛酸及硫酸酯等结合物,故进一步将 CME 菊花提取物口服给药后的健康志愿者、犬及大鼠血浆样品经酸水解或葡萄糖醛酸酶及硫酸酯酶水解后发现,血浆药物木犀草素及芹菜素浓度均显著高于未水解血浆。因此在进行菊花提取物木犀草素、芹菜素药动学研究中,我们推测在大鼠及犬血浆中,木犀草素及芹菜素是以游离和结合两种形式存在于动物血浆中,因此在进行菊花提取物木犀草素、芹菜素在人体、犬以及大鼠药动学研究中,以木犀草素及芹菜素总浓度进行考察更为合理。因此直接测定其中的木犀草素、芹菜素而不将含药血浆水解或酶解后进行测定均不能准确反应两者各自的总浓度,从而不能准确反映 CME 在体内的吸收、利用情况。我们将含药血浆水解后再进行测定,使两者的葡萄糖醛酸、硫酸酯及其他结合物均能水解成游离的单体进行测定以考察两者各自的总浓度更为合理。本实验采用酸水解法测定大鼠血浆中木犀草素及芹菜素总浓度,并利用所建立的方法,研究大鼠口服菊花提取物后的药动学特征及药动学参数。

1 仪器和材料

1.1 仪器

Agilent1100 高效液相色谱仪, DAD 检测器, 四元泵, Agilent 1100 chem station (Agilent 公司)。

1.2 材料

CME (自制); 木犀草素对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号: 111520-200201), 芹菜素 (Sigma 公司, 批号: 111k152Q 纯度 > 99%); 甲醇为色谱纯, 磷酸、超纯水等其余试剂均为国产分析纯; SD 大鼠, 雄性, 200~270 g 清洁级 (浙江医学科学院实验动物中心, 动物质量合格证: 医动字第 22-2001001 号)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Diamonsil ODS C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-0.2% 磷酸 = 55:45; 流速: 1.0 mL · min⁻¹; 检测波长: 350 nm; 柱温: 30

℃; 进样量: 50 μL; 外标法。

2.2 大鼠血样的采集

大鼠禁食 (自由饮水) 12 h 后, 尾静脉采血 0.3 mL, 然后灌胃给 CME (200 mg · kg⁻¹) 的 0.5% CMC-Na 混悬液。在分别于给药后 0.17, 0.50, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10, 12, 24, 48 和 72 h 分别自尾静脉取血约 0.3 mL, 置于用肝素预处理过的离心管中, 3 000 r · min⁻¹ 离心 10 min, 分离血浆, -20℃ 保存, 备用。

2.3 血药浆样本处理及测定

精密移取血浆 0.1 mL 置离心管中, 漩涡加入浓度为 3 mol · L⁻¹ HCl 0.2 mL, 80℃ 水浴中振摇水解 1.5 h, 冰浴冷却, 加 6% HClO₄ 0.1 mL, 边加边混匀, 精密加入 3 mL 乙酸乙酯, 漩涡 3 min, 3 500 r · min⁻¹ 离心 10 min, 精密移取上清液 2 mL, 真空抽干。加入 250 μL 流动相, 漩涡 1 min 使溶解, 15 000 r · min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液 50 μL, HPLC 进样分析。

2.4 方法学考察

2.4.1 方法的选择性 空白血浆、空白血浆 + 对照品及样品血浆的 HPLC 图谱见图 1。从图 1 可知, 空白血浆在木犀草素和芹菜素保留时间处无干扰峰, 说明血浆中的内源性物质不影响测定, 即本方法具有较好的选择性。

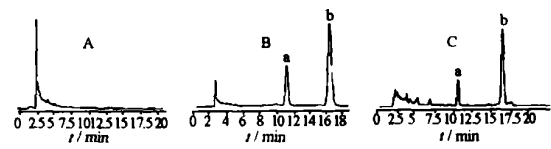


图 1 大鼠血浆 HPLC 图谱

A - 空白血浆; B - 空白血浆 + 对照品; C - 样本; a - 木犀草素; b - 芹菜素

Fig 1 HPLC chromatograms of blank plasma of rats

A - blank rat plasma; B - blank plasma spiked with standard luteolin and apigenin; C - unknown sample; a - luteolin; b - apigenin

2.4.2 标准曲线与定量下限 在含有 0.1 mL 空白血浆的离心管中, 加入木犀草素、芹菜素对照贮备液, 配成含木犀草素分别为 0.045, 0.364, 1.46, 2.91, 4.85, 6.47 和 8.09 mg · L⁻¹, 含芹菜素分别为 0.145, 1.16, 4.63, 9.26, 15.4, 20.6 和 25.7 mg · L⁻¹ 的标准含药血浆质控样品, 每一质量浓度做 5 份, 按“2.3”项下操作, 记录峰面积。以样品峰面积 (A) 对质量浓度 (ρ) 进行线性回归, 结果表明, 木犀草素在 0.045~8.09 mg · L⁻¹, 芹菜素在 0.145~25.7 mg · L⁻¹ 内线性良好, 得回归方程分别为: $A = 82.95\rho + 0.6233$ $r = 0.9957$ ($n = 5$) 和 $A = 70.37\rho + 2.108$ $r = 0.9974$ ($n = 5$)。木犀草素和芹

菜素的定量下限 (LOQ) 分别为 0.045 5 和 0.145 mg• L⁻¹。

2.4.3 绝对回收率 精密取对照品贮备液适量于离心管中, 以空白血浆分别配成木犀草素, 芹菜素质量浓度为 0.045 5, 0.140 2, 91 mg• L⁻¹和 9.26 mg• L⁻¹, 8.09, 25.7 mg• L⁻¹的质控样品, 每一质量浓度平行制备 5份样品, 按“2.3”项下操作, 记录峰面积为 A, 与相同药物浓度条件下纯溶剂样品对照样本进样后得到的相应峰面积 (A) 进行比较, 计算绝对回收率, 结果见表 1。

表 1 木犀草素和芹菜素的绝对回收率 . n = 5

Tab 1 Absolute recovery of luteolin and apigenin in rat plasma n = 5

Compound	Added /mg• L ⁻¹	Found /mg• L ⁻¹	Recovery /%	RSD /%
Luteolin	0.045 5	0.045 3	100	8.6
	2.91	2.82	97	2.3
	8.09	7.83	97	2.7
Apigenin	0.140	0.125	89	8.4
	9.26	8.87	96	1.6
	25.7	24.5	95	3.0

结果表明, 高、中、低 3 个质量浓度木犀草素和芹菜素的绝对回收率均高于 89%。

2.4.4 方法回收率 精密取对照品贮备液适量于离心管中, 以空白血浆分别配成木犀草素, 芹菜素质量浓度为 0.045 5, 0.140 2, 91 mg• L⁻¹和 9.26, 8.09, 25.7 mg• L⁻¹的质控样品, 每一质量浓度制备 5份样品, 按“2.4.2”项下标准曲线制备方法同法测定, 分别记录峰面积并代入标准曲线得到各质量浓度测定值, 与加入量比较得到方法回收率, 结果见表 2。

表 2 木犀草素和芹菜素的方法回收率 . n = 5

Tab 2 Assay recovery of luteolin and apigenin in plasma. n = 5

Compound	Added /mg• L ⁻¹	Found /mg• L ⁻¹	Recovery /%	RSD /%
Luteolin	0.045 5	0.042 2	93	10
	2.91	3.10	107	2.3
	8.09	8.37	103	2.7
Apigenin	0.140	0.147	105	10
	9.26	9.89	107	1.6
	25.7	26.6	104	3.0

结果表明, 高、中、低 3 个质量浓度木犀草素和芹菜素的方法回收率均在 93% ~ 107%。

2.4.5 方法精密度 精密取对照品贮备液适量于离心管中, 以空白血浆分别配成木犀草素, 芹菜素质量浓度为 0.045 5, 0.140 2, 91 mg• L⁻¹和 9.26, 8.09, 25.7 mg• L⁻¹的质控样品, 每一质量浓度制备 5份样品, 按“2.4.2”项下操作, 分别记录木犀草素、

芹菜素峰面积。计算日内精密度 RSD和 5 d 内的日间精密度 RSD, 结果见表 3。

表 3 木犀草素和芹菜素的方法精密度 . n = 5

Tab 3 Precision for determination of luteolin and apigenin n = 5

Compound	ρ /mg• L ⁻¹	Intra day RSD %	Inter day RSD %
Luteolin	0.045 5	11	6.5
	2.91	2.3	1.9
	8.09	1.3	1.4
Apigenin	0.140	8.4	11
	9.26	1.6	2.1
	25.7	2.5	4.4

从表中可知, 该日内和日间 RSD 均小于 11%, 表明该法重复性较好。

2.4.6 样品稳定性 精密取对照品贮备液适量于离心管中, 以空白血浆分别配成高、低浓度的木犀草素, 芹菜素的质控样品 (8.40 和 6.70, 536 和 428 μ g• L⁻¹)。每一质量浓度 3份样品, 按“2.4.2”项下操作, 分别于 2, 4, 8, 24 h 及 1, 3, 7, 15, 30 d 以及 1, 2, 3, 4 次的解冻冻融后测定每一浓度制备 5份样品, 按“2.4.2”项下操作, 每一浓度做 3份样品, 分别计算木犀草素、芹菜素峰面积。分别于 2, 4, 8, 24 h 及 1, 3, 7, 15, 30 d 测定以及 1, 2, 3, 4 次的解冻冻融稳定性, 分别记录计算木犀草素、芹菜素峰面积。与同浓度新鲜质控样品比较后计算回收率, 结果见表 4 及表 5。

表 4 木犀草素和芹菜素的稳定性 . n = 3

Tab 4 Stability of luteolin and apigenin in rat plasma n = 3

Compound	Nom inated concentration / μ g• L ⁻¹	Short-term stability /% deviation				Long-term stability /% deviation			
		2 h	4 h	8 h	24 h	1 d	3 d	7 d	15 d
Luteolin	8.40	103	104	94	94	107	106	100	112
	536	105	113	99	102	97	102	104	110
Apigenin	6.70	100	93	100	100	95	95	96	96
	428	97	104	91	96	87	96	97	103

表 5 样品 解冻冻融稳定性 . n = 3

Tab 5 Freezing-thawing stability of luteolin and apigenin in rat plasma. n = 3

Compound	Nom inated concentration / μ g• L ⁻¹	Freezing-thawing stability /% deviation			
		frequency	1	2	3
Luteolin	8.40	101	101	104	102
	536	98	104	97	98
Apigenin	6.70	104	94	94	94
	428	101	106	99	100

由表 4 5 可知: 样品在贮存期间 (30 d) 内以及经过 4 次解冻冻融过程后仍然较为稳定, 含量不低于初始时间的 94%。

2.5 大鼠体内的药动学

大鼠灌胃给药 (200 mg• kg⁻¹) CME 后, 采集不同时间点血样。测定血浆中木犀草素、芹菜素浓度, 其血浆药物浓度-时间曲线见图 2。使用 3P87 药动学处理软件药动学参数对平均药-时曲线进行拟合。计算所得的结果药动学参数见表 6。

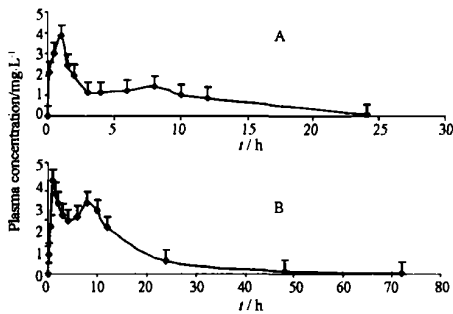


图 2 大鼠口服 CME (200 mg• kg⁻¹) 后木犀草素和芹菜素平均药-时曲线 . n = 5

A- 木犀草素; B- 芹菜素

Fig 2 Mean concentration-time curve of luteolin and apigenin in after a single oral dose of CME (200 mg• kg⁻¹). n = 5

A- luteolin B- apigenin

表 6 大鼠口服 CME (200 mg• kg⁻¹) 后的药动学参数 . n = 5 $\bar{x} \pm s$

Tab 6 Pharmacokinetic parameters of luteolin and apigenin after the oral administration of CME (200 mg• kg⁻¹) to rats n = 5 $\bar{x} \pm s$

Parameters	Luteolin	Apigenin
K_a / h^{-1}	1.72 $\pm$ 0.57	0.237 $\pm$ 0.079
$t_{1/2(\alpha)} / h$	0.774 $\pm$ 0.31	4.82 $\pm$ 0.0
$t_{1/2(\beta)} / h$	6.64 $\pm$ 1.4	8.65 $\pm$ 2.1
$t_{1/2(K_a)} / h$	0.440 $\pm$ 0.18	3.21 $\pm$ 1.3
t_{max} / h	0.730 $\pm$ 0.38	2.91 $\pm$ 0.86
$\rho_{max} / \mu g \cdot L^{-1}$	2.43 $\pm$ 1.2	9.00 $\pm$ 3.0
$AUC / \mu g \cdot h \cdot L^{-1}$	21.4 $\pm$ 2.4	143.4 $\pm$ 5.3
$CL / F / L \cdot kg^{-1} \cdot h^{-1}$	11.8 $\pm$ 2.8	1.60 $\pm$ 0.71
$V / F (c) / L \cdot kg^{-1}$	47.6 $\pm$ 2.1	16.6 $\pm$ 7.5
log time	0.113 $\pm$ 0.035	-

由图 2 可见, 大鼠灌胃给药口服 (200 mg• kg⁻¹) CME 后 8 h 左右二次达峰出现双峰现象, 表明其体内吸收存在肝肠循环, 且芹菜素的血浆浓度大于木犀草素的血浆浓度。

由表 6 可知, 木犀草素及芹菜素的达峰时间 (t_{max}) 分别为 0.730 及 2.91 h 消除半衰期 $t_{1/2(K_e)}$ 分别为 4.33 及 9.91 h; $t_{1/2(\alpha)}$ 分别为 0.774 和 4.82 h; $t_{1/2(\beta)}$ 分别为 6.64 和 8.65 h 说明两者在组织的停留消除时间较在血液中至组织的分布时间相对较长。

3 讨论

3.1 菊花提取物口服给药后, 其中的木犀草素-7- β -

D-葡萄糖苷、芹菜素-7- β -D-葡萄糖苷迅速在体内转变成各自的苷元, 而后经二相代谢转变成葡萄糖醛酸、硫酸酯及其他结合物。因此不经水解或酶解直接测定其中的木犀草素、芹菜素均不能准确反应两者总浓度, 从而不能准确反映 CME 在体内的吸收、利用情况。因此我们将血浆水解后再进行相应的处理, 以便结合物能水解成游离的单体进行测定。本实验所采用的水解条件, 通过单因素实验考察而确定。为较理想的水解条件。实验中盐酸的加入也可起到沉淀蛋白的作用, 故需漩涡加入以防止少量目标化合物被成团的蛋白质包围而不能充分释放水解。

3.2 由方法学考察可见本法简便、准确、灵敏, 重现重复性好, 满足对生物样本分析的方法学要求。利用本法对 CME 在大鼠体内的药动学进行了研究, 结果表明, 健康大鼠单次口服 CME (200 mg• kg⁻¹) 后, 根据 AIC 最小原则, 确定其符合二室吸收动力学模型 (木犀草素及芹菜素 AIC 分别为 6.05 与 0.516, 权重系数均分别为 1 和 $1 \cdot C^{-1} \cdot C^{-1}$)。从药动学参数可以看出, 木犀草素、芹菜素存在一很短的滞后时间 ($t_{lag} = 0.07$ h), 芹菜素并无此滞后时间, 木犀草素及芹菜素两者的达峰时间 (t_{max}) 分别为 0.730 及 2.91 h 吸收半衰期 $t_{1/2(K_a)}$ 分别为 0.440 及 3.21 h 说明 CME 中的木犀草素和芹菜素的苷迅速经肠道微生物和小肠上皮细胞水解酶水解而吸收。分布相半衰期 $t_{1/2(\alpha)}$ 分别为 0.774 和 4.82 h 消除相半衰期 $t_{1/2(\beta)}$ 分别为 6.64 和 8.65 h 说明 CME 木犀草素和芹菜素在体内的停留时间并不长, 因此应考虑 CME 两者有效浓度持续时间的问题。

3.3 本实验室已经对犬、家兔口服 CME 后, 血浆木犀草素及芹菜素浓度进行了测定, 有意义的是, 在犬血浆中, 木犀草素浓度高于芹菜素浓度, 在家兔血浆中经只检测到木犀草素^[5], 而在本实验中观察到大鼠血浆中芹菜素浓度高于木犀草素浓度。我们体外肠道微生物实验发现, 上述 3 种动物肠道微生物均可以将 CME 水解代谢为木犀草素和芹菜素, 因此不同动物对木犀草素、芹菜素的吸收和吸收后的处置可能存在很大的差别, 有关这方面的研究, 本实验室正在进行中。

REFERENCES

[1] HU L H, CENG Z L. Structure elucidation of a new n-pentyl fructofuranoside in *Dendranthema morifolium* (Ramat) tzevl [J]. *Acta Bot Sin* (植物学报), 1997, 39(1): 85-90

[2] HU B B, JIANG H D, YANG J *et al*. Determination of luteolin and luteolin-7- β -D-glucoside in *chrysanthemum morifolium* ramat. from different collection time by RP-HPLC [J]. *J Zhejiang Univ (Med Sci)* (浙江大学学报 医学版), 2004, 33(1): 29-32.

N-三甲基壳聚糖对睾酮凝胶在兔体内药动学的作用研究

何文¹, 张冕², 何平平² (1. 武汉大学人民医院药学部, 武汉 430060; 2. 武汉大学药学院, 武汉 430072)

摘要: **目的** 研究 *N*-三甲基壳聚糖 (*N*-trimethyl chitosan, TMC) 对睾酮凝胶在兔体内药动学的作用, 考察 TMC 的透皮吸收促进作用效果。 **方法** 用壳聚糖及碘甲烷为主要原料, 合成季铵化程度分别为 40% 和 60% 的 TMC, 即 TMC40 和 TMC60, 通过 ¹H-NMR 确定其季铵化程度。以泊洛沙姆 P407 为基质制备 4 份凝胶, 以睾酮为模型药物, 以月桂氮 酮 (2%) 为阳性对照, 以不加促渗剂为阴性对照, 另两份凝胶分别含 TMC40 和 TMC60 各 5% 作为促渗剂。经皮给药后采用 RP-HPLC 测定兔血浆中的睾酮浓度, 计算药动学参数, 对 4 种凝胶进行比较, 考察 TMC40、TMC60 的促渗效果。 **结果** 经 ¹H-NMR 确定合成得到的 TMC40、TMC60 季铵化程度分别为 38.8% 和 67.2%。主要药动学参数 t_{max} 、 C_{max} 、 K_a 、AUC 经方差分析及双单侧 *t* 检验后, TMC60 较空白组及月桂氮 酮组各参数均具有显著性差异 ($P < 0.05$), TMC40 较空白组有明显促进作用 ($P < 0.05$), 较月桂氮 酮组除参数 K_a 外无显著性差异 ($P > 0.05$)。 **结论** TMC60 具有显著的促进睾酮凝胶透皮吸收作用, TMC40 较空白组促进吸收作用明显, 但效果与 2% 月桂氮 酮相比无显著性差异。

关键词: *N*-三甲基壳聚糖; 睾酮; 凝胶; 药动学

中图分类号: R969 文献标识码: A 文章编号: 1001-2494(2007)05-0378-04

Pharmacokinetic Study on Testosterone Gel Enhanced by *N*-Trimethyl Chitosan in Rabbits

HE Wen¹, ZHANG Mian², HE Ping-ping² (1. Department of Pharmacy, Renmin Hospital, Wuhan University, Wuhan 430060 China; 2. Department of Pharmacy, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

ABSTRACT: **OBJECTIVE** To study the pharmacokinetics of testosterone gel enhanced by *N*-trimethyl chitosan (TMC) in rabbits and to estimate the penetration enhancement effect of TMC. **METHODS** Two kinds of TMC with different degree of quaternization, i.e. TMC40 and TMC60, were synthesized by a two-step method using chitosan and methyl iodide. The degree of quaternization of TMC was determined by ¹H-NMR. Four kinds of gels were prepared using testosterone as model drug. Azone (2%) was used as penetration enhancer in the positive control group. No enhancer was used in the blank control. TMC40 (5%) and TMC60 (5%) was used as penetration enhancer respectively in the other two groups. Plasma concentrations of testosterone were determined using RP-HPLC method. Pharmacokinetic parameters were calculated to estimate the influence of TMC on penetration enhancement. **RESULTS** The degree of quaternization of TMC40 and TMC60 were 38.8% and 67.2%, respectively. The main pharmacokinetic parameters were compared by *t* test. The pharmacokinetic parameters of TMC60 showed significant differences compared with both Azone and the blank control ($P < 0.05$), as well as TMC40 compared with the blank control ($P < 0.05$). However, no significant difference was found between TMC40 and Azone group except the parameter K_a ($P > 0.05$). **CONCLUSION** TMC60 has significant penetration enhancement on the transdermal delivery of testosterone gel. The penetration enhancement of TMC40 is stronger than that of the blank control significantly, however the difference is not significant compared with Azone (2%).

KEY WORDS *N*-trimethyl chitosan; testosterone; gels; pharmacokinetics

壳聚糖 (chitosan, CS) 是一种天然聚阳离子多糖, 具有良好的生物降解性和生物相容性, 是药物黏膜吸收的促进剂。有研究表明^[1], 质子化的壳聚糖

能通过正、负电荷的作用打开黏膜紧密接口, 从而使药物穿透黏膜。在壳聚糖分子中引入烷基或羧甲基等, 可增加其黏膜促透性。已有研究表明^[2], *N*-三

[3] CHAN E C, PANNANGPETCH P, WOODMAN O L. Relaxation to flavones and flavonols in rat isolated thoracic aorta: mechanism of action and structure-activity relationships [J]. *Cardiovascular Pharmacology*, 2000, 35(2): 326-329.
[4] LIL P, JIANG H D, WU H H, et al. Simultaneous determination of luteolin and apigenin in dog plasma by RP-HPLC [J]. *J*

Pharm Biomed Anal 37 (2005): 615-620.
[5] LIL P, JIANG H D, WU H H, et al. Pharmacokinetics of active component of Chrysanthemum morifolium extracts and its acid hydrolysate in rabbits [J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2005, 40(24): 1884-1886.

(收稿日期: 2005-12-24)

作者简介: 何文, 副教授 Tel: (027) 65057677 E-mail: hw_zcd@163.com