

天山雪莲微乳的小鼠局部药代动力学

邢建国¹, 王新春^{2,3*}, 马晓莉², 袁勇², 王丽萍³, 陈卫军²

(1. 新疆维吾尔自治区药物研究所, 乌鲁木齐 830004;

2. 石河子大学医学院一附院, 新疆 石河子 832008; 3. 石河子大学药学院, 新疆 石河子 832002)

[摘要] 目的: 制备天山雪莲微乳, 考察天山雪莲微乳在小鼠腹部皮肤滞留量与时间的关系及其局部经皮给药的药代动力学, 探讨其皮肤吸收作用。方法: 测定制备样品的 Zeta 电位、多分散指数、粒径分布等理化指标; 以绿原酸、芦丁为指标性成分, 采用 HPLC 测定不同给药时间皮肤中绿原酸、芦丁生物滞留量, DAS 软件拟合药物动力学参数。结果: 天山雪莲微乳平均粒径 54.51 nm, 多分散系数 0.281, Zeta 电位 -0.687 mV; 在小鼠皮肤中滞留量的动力学过程符合二室模型。结论: 天山雪莲微乳中有效成分能较快渗透进入皮肤, 并在皮肤局部较长时间蓄积。

[关键词] 天山雪莲; 微乳; 皮肤局部; 药代动力学

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)20-0153-04

Local Pharmacokinetic of *Saussurea involucrata* Microemulsion in Rat

XING Jian-guo¹, WANG Xin-chun^{2,3*}, MA Xiao-li²,

YUAN Yong², WANG Li-ping³, CHEN Wei-jun²

(1. Xinjiang Institute of Materia Medica, Urumqi 830004, China;

2. First Affiliated Hospital, School of Medicine, Shihezi University, Shihezi 832008, China;

3. School of Pharmacy, Shihezi University, Shihezi 832002, China)

[Abstract] **Objective:** To prepare *Saussurea involucrata* microemulsion, investigate relationship between retention volume and time of of *S. involucrata* microemulsion in abdominal skin of mice, investigate its pharmacokinetics of local transdermal drug delivery, and investigate its skin absorption effect. **Method:**

[收稿日期] 20120621(003)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30960528)

[第一作者] 邢建国, 研究员, 从事民族药新制剂及新剂型研究, Tel:0991-2300682, E-mail:xjguodd@163.com

[通讯作者] *王新春, 主任药师, 硕士生导师, 从事中药新药开发及其新型纳米给药系统研究, Tel:0993-2855827, E-mail:cwjwxc@163.com

- [4] 范云双, 姚智, 滕杰, 等. 绿升麻中具有抗肿瘤活性的三萜类化合物[J]. 中草药, 2007, 38(2):167.
- [5] 刘兆平, 杨陟华, 朱茂祥, 等. 黑升麻的雌激素活性及其对人类乳腺癌 MCF27 细胞雌激素受体水平的影响[J]. 卫生研究, 2001, 30(2):77.
- [6] 薛宝云, 李文, 李丽, 等. 防风色原酮甙类成分的药理活性研究[J]. 中国中药杂志, 2000, 25(5):971.
- [7] 张丹, 徐克惠, 段秀荣. 希明婷片治疗妇女围绝经期综合征的临床观察[J]. 现代妇产科进展, 2006, 15(12):934.
- [8] 王冰, 张振秋, 孙艳涛. HPLC 切换波长法同时测定升麻中 5 种成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2011, 31(2):391.
- [9] 靳波, 刘友平, 陈鸿平, 等. 西升麻中三萜皂苷类分离鉴定及药材质量标准研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(13):103.
- [10] 李庆辉. HPLC 法测定祛风胜湿颗粒中升麻苷的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2003, 9(3):64.
- [11] 王颖琳, 沙春洁, 刘万卉, 等. 液相色谱-串联质谱法测定 Beagle 犬血浆中升麻苷 H-1 的浓度[J]. 药物分析杂志, 2011, 31(8):1453.

[责任编辑 邹晓翠]

Characteristics of prepared *S. involucrata* microemulsion were determined including polydispersity index, size distribution and Zeta potential and other physical and chemical properties. With chlorogenic acid and rutin as indexes, biological retention volume of chlorogenic acid and rutin in administration skin with different time was determined by HPLC, and pharmacokinetic parameters were fitted by DAS software. **Result:** Characteristics of prepared *S. involucrata* microemulsion including mean particle size, polydispersity index and Zeta potential were 54.51 nm, 0.281 and -0.687 mV. Pharmacokinetic process of microemulsion in rats' abdominal skin was fitted with two compartment model. **Conclusion:** Active ingredients of *S. involucrata* microemulsion could quickly permeate into skin, and accumulate long time in local skin.

[Key words] *Saussurea involucrata*; microemulsion; local skin; pharmacokinetic

经皮给药制剂具有可避免肝脏首过效应、生物利用度较高、胃肠刺激少等优点^[1],越来越受到推崇。微乳是一种外观透明、液滴粒径介于 10~100 nm、热力学稳定的胶体分散体系^[2-3]。微乳作为经皮给药载体,可显著增加难溶性药物的溶解度,在皮肤两侧快速形成较高的浓度梯度,从而大大提高药物的透皮速率,缩短时滞。此外,微乳液滴的特殊构造,经皮给药后药物释放时间更长、血药浓度更平稳^[4]。因此,近年来微乳已成为经皮给药载体的研究热点。

天山雪莲为菊科凤毛菊属多年生草本植物,是维吾尔医常用的民族药。主要含黄酮、苯丙素、生物碱、倍半萜、挥发油等化学成分,具有散寒除湿、活血通经、强筋助阳等功效。据文献报道,天山雪莲提取物中的黄酮类成分和苯丙素类成分具有明显抗炎镇痛、抗风湿作用^[5]。本文在前期天山雪莲巴布剂^[6]及凝胶剂^[7]研究的基础上,进行天山雪莲微乳新型纳米透皮给药的研究,以天山雪莲中绿原酸及芦丁 2 种药效成分为指标成分,通过小鼠皮肤给药,测定不同时间点天山雪莲中指标性成分绿原酸和芦丁的单位体积皮肤滞留量,考察皮肤局部药物动力学,并用 DAS 软件拟合药物动力学参数,探讨其皮肤药动学规律,为天山雪莲微乳的研究提供依据。

1 材料

LC-20AT 型高效液相色谱仪(日本岛津),HJ27 型六联恒温磁力搅拌器(金坛市华峰仪器有限公司),AE 型 1/200 万电子天平(梅特勒 2 托利多仪器上海有限公司),DFG2781 型高速离心机(上海安亭科学仪器厂),XW-80A 型旋涡混合器(江苏海门市麒麟医用仪器厂),FSH-II 型高速电动匀浆器(江苏省金坛市正基仪器有限公司),TGL-16C 型高速离心机(上海安亭科学仪器厂)。

绿原酸、芦丁对照品(中国药品生物制品检定所,批号分别为 110753-200413,100080-200707),天

山雪莲提取物(新疆自治区药物研究所提供),肉豆蔻酸异丙酯(IPM,浙江物美化学有限公司),油酸(OA,天津市光复精细化工研究所),油酸乙酯(EO,天津市光复精细化工研究所),聚氧乙烯化蓖麻油(Cremophor RH-40,德国 BASF 公司),聚氧乙烯蓖麻油(Cremophor EL-35,德国 BASF 公司),肝素钠(徐州万邦生化制药有限公司,批号 0110115),甲醇、乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

昆明种小鼠,雄性,体重(25~30)g,由石河子大学实验动物中心提供,合格证号 2009-0006。

2 方法与结果

2.1 天山雪莲微乳的制备^[8] 依次称取处方量 OA, Cremophor RH-40 及乙醇置西林瓶中,搅拌均匀,缓慢滴加蒸馏水至规定量,搅拌 1 h,得空白微乳。精密称定处方量天山雪莲提取物加至空白微乳中,搅拌 2 h,得载药微乳,按处方量制备微乳,微乳含药量为 $6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.2 粒径、Zeta 电位、多分散指数(PDI)值的测定 取稀释 5 倍的天山雪莲微乳 50 mL,于 25 °C 下用激光粒度分析仪测定其粒径大小及分布,结果天山雪莲微乳 3 次测定的平均粒径(54.51 ± 2.21) nm, PDI 为 0.281, Zeta 电位 -0.687 mV。

2.3 皮肤局部药代动力学试验

^[9]

2.3.1 小鼠皮肤样品的制备与处理 健康小鼠 33 只,试验前 1 d 脱毛膏小心除去腹部皮肤毛,禁食 1 d,自由饮水。3 只小鼠不给药,作为空白。将天山雪莲微乳(0.6%)用棉签均匀的涂抹于腹部脱毛处 0.5 mL,15 min 内抹完,给药量 3 mg/只,分别于给药后 0.166, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 h 处死小鼠($n=3$),用生理盐水反复擦拭皮肤表面,剥离皮肤(2.5 cm × 4 cm),去除附着的肌肉,剪碎,放入玻璃组织匀浆器中,加 5 mL 甲醇-乙腈(3:1)混合溶剂研磨,转移至离心管中超声 30 min,离心 10 min ($1 \times 10^4 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$),取上清液加 0.2 mol·L⁻¹ 盐酸 200 μL,

混匀,离心 10 min,取上清液于 40 ℃ 水浴上 N_2 流吹干,残渣加甲醇-乙腈(3:1)混合溶剂 200 μL 复溶,涡旋 5 min,离心 10 min,取上清液 20 μL 进行测定。

2.3.2 绿原酸和芦丁分析方法的建立

2.3.2.1 色谱条件 Waters ODS 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-0.6%(B)磷酸溶液(0~13 min, 11% A; 13~16 min, 11%~16% A; 16~50 min, 16% A),检测波长 353 nm,流速 1.0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$,柱温 35 ℃,进样量 20 μL 。

2.3.2.2 标准曲线的绘制 分别精密称取绿原酸和芦丁对照品适量,分别置于 10 mL 量瓶中,加甲醇定容,精密吸取绿原酸和芦丁对照品储备液适量,置于 300 μL 的空白皮肤匀浆提取物中,按倍数稀释法制成不同质量浓度的绿原酸和芦丁混合样品,按 2.3.1 项下方法处理。以质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,得绿原酸标准曲线 $Y = 20\ 862X - 1\ 839.4$ ($r = 0.999\ 7$),线性范围 0.03~12 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$;芦丁标准曲线 $Y = 26\ 736X - 10\ 651$ ($r = 0.999\ 7$),线性范围 0.27~18 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.3.3 小鼠皮内滞留量的测定 天山雪莲微乳中绿原酸和芦丁在小鼠腹皮单位面积的滞留量随时间的变化见图 1, 2 ($n = 3$)。

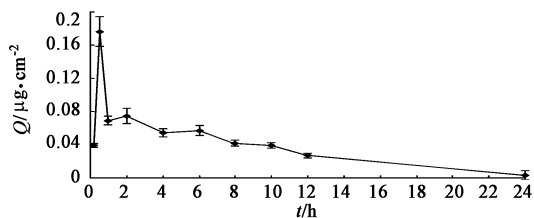


图1 天山雪莲微乳中绿原酸的皮内滞留量时间曲线

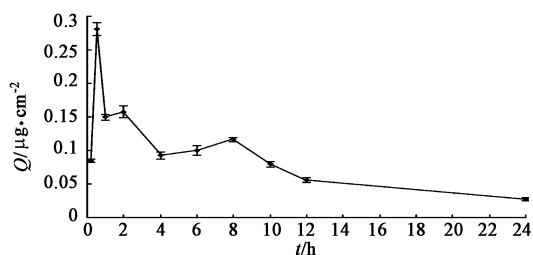


图2 天山雪莲微乳中芦丁的皮内滞留量-时间曲线

2.4 数据处理

2.4.1 模型拟合优度 小鼠腹部皮肤给药后,取不同时间点测得的单位面积皮肤中绿原酸、芦丁的滞留量数据, DAS 2.0 药动学软件统计程序处理,进行房室模型拟合,拟合度参数见表 1。结果表明,天山雪莲微乳在皮肤中的滞留量的动力学过程以二室模型拟合效果好。

表1 小鼠腹皮给药后绿原酸及芦丁滞留量数据

拟合参数	二室模型拟合度参数	
	绿原酸	芦丁
A	0.897	3.476
α	4.252	6.40
B	0.079	0.16
β	0.082	0.072
房室数	2	2
AIC	-64.001	-50.263
AE	0.001	0.002
RE	5.419	0.197
R^2	0.974	0.956
SBC	-62.186	-48.447
Fitting times	21	367
权重系数	c^{-2}	c^{-2}

注:表中 A 代表分布相初质量浓度; B 代表消除相初质量浓度; α 代表分布相速率常数; β 代表消除相速率常数。

2.4.2 药动学参数的计算 据文献方法,以二室模型为拟合模型,权重为 $1/c^2$,用 DAS 2.0 药动学软件统计程序统计有效成分绿原酸、芦丁的药动学参数,房室模型参数结果见表 2,统计矩参数结果见表 3。

表2 小鼠腹皮给药后绿原酸及芦丁滞留量动力学房室模型参数

房室参数/单位	参数值	
	绿原酸	芦丁
$t_{1/2\alpha}/\text{h}$	0.163	0.108
$t_{1/2\beta}/\text{h}$	8.495	9.561
$V_1/F/L$	0.202	0.178
$CL/F/L\cdot\text{h}^{-1}$	0.138	0.169
$AUC(0-t)/\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$	0.885	1.889
$AUC(0-\infty)/\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$	0.959	2.05
K_{10}/h^{-1}	0.685	0.951
K_{12}/h^{-1}	3.071	4.932
K_{21}/h^{-1}	0.578	0.59

注:表 2 中 $t_{1/2\alpha}$ 代表分布相半衰期; $t_{1/2\beta}$ 代表消除相半衰期; $t_{1/2Ka}$ 代表吸收相半衰期; AUC 代表药-时曲线下面积; K_{12} 代表中央室向周边室的转运速率常数; K_{21} 代表周边室向中央室的转运速率常数。

3 讨论

天山雪莲微乳中活性成分绿原酸和芦丁在小鼠腹皮中滞留量的动力学过程符合二室模型。药代动力学结果表明,天山雪莲微乳透皮给药吸收迅速,10

表 3 小鼠腹皮给药后绿原酸及芦丁
滞留量动力学统计矩参数

统计矩参数	单位	参数值	
		绿原酸	芦丁
AUC(0-t)	mg·L ⁻¹ ·h ⁻¹	0.841	1.819
AUC(0-∞)	mg·L ⁻¹ ·h ⁻¹	0.862	1.853
AUMC(0-t)		5.634	14.675
AUMC(0-∞)		6.282	15.677
MRT(0-t)	h	6.701	8.069
MRT(0-∞)	h	7.287	8.462
VRT(0-t)	h ²	24.463	41.039
VRT(0-∞)	h ²	38.351	49.085
t _{1/2z}	h	4.398	3.793
T _{max}	h	0.5	0.5
CL _z /F	L·h ⁻¹	0.154	0.187
V _z /F	L	0.975	1.022
Zeta	h ⁻¹	0.158	0.183
C _z (尾点回归值)	mg·L ⁻¹	0.003	0.006
C _{max} /mg·L ⁻¹	0.176	0.281	

min 即可检测到,在 30 min 达 T_{max},说明药物能较快渗透进入皮肤。绿原酸、芦丁的分布相半衰期 t_{1/2α} 分别为 0.163,0.108 h,说明药物从中央室向周边室分布较快。绿原酸、芦丁的 K₁₂均 > 相应的 K₂₁,表明药物从中央室向周边室的转运速率均大于药物从周边室向中央室的转运速率。绿原酸、芦丁二者在皮内的代谢消除较慢,生物半衰期分别为 4.398,3.793 h,24 h 后仍能检测到,表明天山雪莲微乳中的活性成分能较快渗透进入皮肤,并能在皮肤局部较长时间蓄积,有利于药物在皮肤深层长时间发挥药效作用^[10]。试验表明微乳是天山雪莲提取物局部皮肤给药的良好载体,宜进行更深的研究。

由于绿原酸的分子结构中含有酯键、不饱和键和多元酚而不稳定,容易氧化、水解和见光分解,而

芦丁分子结构中含有酚羟基容易氧化和水解成苷元,2 种有效成分在提取过程中都易分解,尤其是绿原酸很难被检测到,因此需要在提取溶剂中加入抗氧化剂。绿原酸和芦丁在酸性环境下能够抑制电离,其分子状态比解离状态更加稳定,因此,加入适当浓度的盐酸有助于有效成分在提取过程中的稳定。

[参考文献]

[1] 祁荣,贺锐锐,李博,等.经皮给药系统研究新进展[J].中医外治杂志,2007,16(1):3.

[2] Aviram S, Abraham A. Microemulsions as carries for drugs and nutraceuticals[J]. Adv Colloid Interface Sci. 2006,21(5):47.

[3] 王晓黎,蒋雪涛.微乳在药剂学上的应用[J].解放军药理学学报,2004,16(2):88.

[4] 吴晓辉,刘玉玲.微乳作为经皮给药载体的研究进展[J].中国药理学杂志,2006,11(41):1681.

[5] 翟科峰,段红,邢建国,等.天山雪莲提取物纯化前后各部位抗炎镇痛作用[J].中国医院药学杂志,2010,30(5):374.

[6] 邢建国,翟科峰,王新春,等.透皮促进剂对天山雪莲巴布剂中三种有效成分经皮渗透的影响[J].中国中药杂志,2009,34(11):45.

[7] 黄贤惠,邢建国,王新春,等.正交设计法优选天山雪莲凝胶剂基质处方[J].中国中药杂志,2010,35(14):1803.

[8] 谢敏,邢建国,王新春,等.天山雪莲透皮微乳制备处方的优化[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(1):5.

[9] 陈燕军,张军斌,熊欣,等.原花青素柔性纳米脂质体小鼠皮肤局部药代动力学[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(14):1.

[10] 汤洁,王剑,沈丽杰.小鼠血浆及组织中芦丁和槲皮素 HPLC 检测方法的建立[J].沈阳药科大学学报,2000,17(21):49.

[责任编辑 仝燕]