

家兔静脉注射辣椒碱纳米乳及溶液的药动学比较研究

张鹏威¹, 苏文琴¹, 张莉^{2*}, 徐贵华³, 刘明生¹

(1. 海南医学院药学院, 海口 571101; 2. 武警医学院药剂教研室, 天津 300162;

3. 罗田万密斋医院药剂科, 广东 罗田 436600)

[摘要] 目的: 建立 HPLC-荧光法测定家兔血浆中辣椒碱含量, 并比较家兔静脉注射辣椒碱纳米乳及辣椒碱溶液的药动学参数差异。方法: 采用双周期交叉试验设计, 6 只家兔分别单剂量注射辣椒碱纳米乳及溶液, 分别在给药后 3, 6, 9, 12, 15, 25, 40, 60, 90, 120 min 时取血, 以 HPLC-荧光法测定血药浓度, 并计算主要药动学参数。结果: 辣椒碱在 0.197 ~49.3 g·L⁻¹ ($r=0.9996$) 内线性良好, 最低检测限为 5.9 ng·mL⁻¹, 回收率为 102.5% ~107.6%, RSD <5%。辣椒碱纳米乳及溶液的消除半衰期 $t_{1/2}$ 分别为 (11.77 ±2.32) min 和 (9.53 ±2.19) min, AUC 为 (5311 ±1324.6) ng·mL⁻¹·kg⁻¹·min 和 (4909.5 ±1110.4) ng·mL⁻¹·kg⁻¹·min。结论: HPLC-荧光法简便、准确、灵敏, 适用于辣椒碱的血药浓度测定。家兔静脉注射辣椒碱纳米乳及溶液的主要药动学参数比较无显著性差异。

[关键词] 辣椒碱; 药代动力学; 高效液相色谱荧光法; 纳米乳

[中图分类号] R284.1, R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)18-0106-03

Pharmacokinetics in Rabbits after Intravenous Injection of Capsaicin Nanoemulsions and Solution

ZHANG Peng-wei¹, SU Wen-qin¹, ZHANG Li^{2*}, XU Gui-hua³, LIU Ming-sheng¹

(1. School of Pharmacy, Hainan Medical College, Haikou 571101, China; 2. Department of Pharmaceutics,

Medical College of Chinese People's Armed Police Force, Tianjin 300162, China;

3. Department of Pharmaceutics, Luotian Wanmizhai Hospital, Luotian 438600, China)

[Abstract] **Objective:** To develop an HPLC-FLU method for the determination of capsaicin in rabbit plasma and to study its pharmacokinetics. **Method:** Six rabbits were given capsaicin nanoemulsions and ethanol solution (1mg·kg⁻¹) via ear vein by double cycle crossover design, and after 3, 6, 9, 12, 15, 25, 40, 60 and 120 min, blood samples were collected. HPLC-FLU was established to determine the plasma concentration of capsaicin and the pharmacokinetic evaluation was carried out. **Result:** The linear range of capsaicin was 0.197-49.3 mg·L⁻¹ ($r=0.9996$) and the limit of detection of capsaicin was 5.9 ng·mL⁻¹, the average recovery was 102.5% ~107.6% with RSD <5%. The $t_{1/2}$ of capsaicin nanoemulsions and solution was (11.77 ±2.32) min and (9.53 ±2.19) min respectively, and the AUC was (5311 ±1324.6) ng·mL⁻¹·kg⁻¹·min and (4909.5 ±1110.4) ng·mL⁻¹·kg⁻¹·min respectively. **Conclusion:** This assay method is simple, precise and sensitive enough for the pharmacokinetic study of capsaicin. The pharmacokinetics parameters between capsaicin nanoemulsions and solution had no significant difference (t test, $P>0.05$).

[Key words] capsaicin; pharmacokinetics; HPLC-FLU; nanoemulsions;

[收稿日期] 20100608(005)

[第一作者] 张鹏威, 博士, 讲师, 主要从事药物制剂及药物质量标准化研究, Tel: 0898-66894429, E-mail: zpw0803@163.com

[第一作者] * 张莉, 教授, 主要从事药物新制剂的开发研究, Tel: 022-60578196, E-mail: zhli62tianjin@yahoo.com.cn

辣椒碱 (capsaicin) 是茄科植物辣椒 *Capsicum annuum* L. 的果实辣椒中所含的主要成分。它通过选择性拮抗神经传导介质 P 物质发挥药效。在临床上辣椒碱除用于治疗关节炎及关节痛外,还可治疗肌肉酸痛、牙痛、带状疱疹后遗神经痛、糖尿病性神经痛和三叉神经痛、血管舒缩性鼻炎及皮肤瘙痒等病症^[1]。该药已被《美国药典》和《马丁代尔药典》收录。美国权威医学资料《临床医生案头手册》(PDR) 中将辣椒碱作为第一推荐的外用镇痛药。但辣椒碱具有较强的首过效应,其半衰期较短,在大鼠体内,辣椒碱的半衰期为 7.06 min,在新西兰白兔体内代谢半衰期为 12.44 min^[2-3]。

纳米乳是一新型药物传递系统,具有延长药物体内代谢半衰期作用^[4]。本实验采用 HPLC-荧光法测定辣椒碱乙醇溶液和纳米乳在家兔体内的药-时曲线,以了解纳米乳对辣椒碱的药动学特征的影响。

1 材料

1.1 试验动物 健康雄性家兔 6 只,12~15 周龄,体重 3.0~3.5 kg,由武警医学院实验动物中心提供,合格证号武检 2007R021。

1.2 仪器与试剂 ZetaSizer HS2000 激光粒度仪(英国 Malvern 公司),Shimadzu LC-10A 高效液相色谱仪(日本岛津),Fluor LC304 荧光检测器(LINEAR,美国),恒温磁力搅拌器(江苏金坛市华欧实验仪器厂),PH-3C pH 仪(上海雷磁仪器厂)。

辣椒碱(南京天舒食品添加剂有限公司,纯度 95%,批号 TS060315),辣椒碱对照品(中国药品生物制品检定所,批号 0839-200102),水为重蒸馏水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 试验样品的制备 辣椒碱溶液的制备:辣椒碱用 10% Tween80-10% 乙醇溶液制成辣椒碱 3 g·L⁻¹ 的溶液。

辣椒碱纳米乳 (NE) 的制备:取苯甲醇 35.5 g、1,2-丙二醇 26.7 g、吐温-80 13.3 g、水 25.0 g,用电磁搅拌器混合 10 min,室温下放置 24 h 使达到完全平衡,即得空白纳米乳。取空白纳米乳 20 mL,加入 60 mg 辣椒碱,搅拌均匀即得辣椒碱纳米乳。经激光粒度仪测得纳米乳粒径为 (32.5 ± 9.2) nm,聚合度分布系数为 0.22。

2.2 给药方案 采用单剂量自身交叉双周期对照注射给药。将 6 只受试动物随机分成 2 组,每组 3

只。每次给药间期 7 d,给药剂量均为 1 mg·kg⁻¹。

2.3 色谱条件 色谱柱为 Shimadzu VP-ODS C₁₈ 柱,以甲醇-水-磷酸 (85 15 0.1) 为流动相,流速 1 mL·min⁻¹,柱温 30℃;激发波长为 280 nm,检测波长为 310 nm,进样量为 20 μL。

2.4 血样采集与处理 于试验前 12 h 开始禁食不禁水。给药前,在兔耳中央动脉埋植人用静脉留置针,并取空白血液。在给药后 3,6,9,12,15,25,40,60,120 min 取血约 2 mL,立即移入涂有肝素的试管中,4 000 rpm 离心 6 min,分离得到血浆样品,置 -18℃ 冰箱中冷冻保存,备用。在取血后,立即在留滞针内注入 0.2 mL 100 U·mL⁻¹ 肝素钠溶液,以防止堵塞针管。

取血浆样品 1.0 mL,置 10 mL 离心管中,加入内标溶液 (0.1 g·mL⁻¹ 萘溶液) 20 μL,加入氯仿 5.0 mL,漩涡混合 1 min,振摇 30 min,3 000 rpm 离心 20 min。取氯仿层 4.0 mL,40℃ 水浴氮气流下挥干氯仿,加流动相 100 μL 溶解,取 20 μL 注入色谱仪,记录色谱图。

2.5 专属性试验 按 2.3 项下中的色谱条件进行色谱分析,辣椒碱及内标物萘与血浆中的内源性物质分离良好,说明该方法的专属性良好。色谱图见图 1。

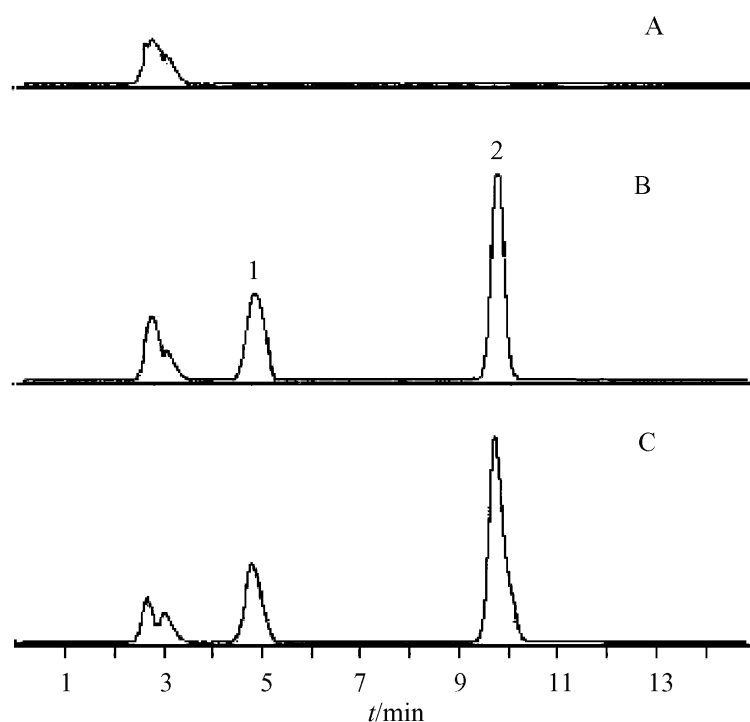


图 1 空白血浆 (A)、辣椒碱加内标血浆 (B)、检测样品 (C) HPLC 色谱图
1. 辣椒碱; 2. 萘

2.6 标准曲线的绘制 精密量取 7 份空白兔血浆 1.0 mL 分别置于 10 mL 的具塞离心管中,分别精密加入内标溶液 20 μL 和辣椒碱系列标准溶液,配制成浓度为 0.019 74, 0.049 34, 0.197 4, 0.493 4, 1.234, 2.467, 4.934 mg·L⁻¹ 的血浆样品溶液,按 2.4 项血样

处理方法操作,记录色谱图和峰面积。以浓度 c 对 A/A_s (辣椒碱的峰面积 A 对内标物峰面积 A_s 的比值) 进行线性回归,得标准曲线方程 $A/A_s = 1.063 \times 10^{-3} c + 0.1386$ ($R = 0.9995$),辣椒碱在 $0.197 \sim 49.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 内线性良好。本法最低检测限为 $5.9 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.7 精密度试验 精密量取空白兔血浆 1.0 mL ,照 2.1 项下方法配制辣椒碱的浓度分别约为 $0.45, 4.8, 36 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (即低、中、高) 3 个浓度的血浆样品,依法测定。根据随行标准曲线计算出浓度。于同一天内每个浓度测定 6 次,计算出日内标准偏差,每天测定一次,连续测定 3 d, 求出日间标准偏差。求得方法的日内精密度分别为 $5.8\%, 1.2\%, 1.3\%$; 日间精密度分别为 $7.8\%, 2.3\%, 1.7\%$ 。

2.8 回收率试验 精密量取空白兔血浆 1.0 mL ,照 2.1 项下方法配制辣椒碱的浓度分别约为 $0.72, 4.8, 36 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (即低、中、高,每一浓度 3 个样品) 3 个浓度的血浆样品,依法测定。以测得的响应值与实际加入量相比为回收率,所得回收率分别为 $113.8\%, 90.4\%, 93.1\%$; 对应的 RSD 分别为 $6.1\%, 10.1\%, 8.4\%$ 。

2.9 稳定性试验 取反复冻融 3 次的 $4.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的样品 3 份,经 2.4 项下血浆处理方法,与未经反复冻融处理的辣椒碱对照品溶液比较,考察血清样品的冻融稳定性,结果样品 RSD 为 1.0% ,表明样品反复冻融 3 次稳定。取同样浓度样品,按 2.4 项下方法处理后测定,并于室温放置,每 2 h 测定 1 次,连续测定 6 次。结果表明 RSD 为 3.3% ,表明样品处理后室温放置 10 h 稳定。

2.10 血药浓度及药动学结果 采用 3P97 程序计算 AUC、消除半衰期 $t_{1/2}$ 、清除率 CL 等药动学参数,结果见表 1,平均血药浓度-时间曲线见图 2。

表 1 单剂量注射辣椒碱的药物动力学参数 ($n=6$)

参数	Nanoemulsions	Solution
k/min^{-1}	0.055 ± 0.012	0.079 ± 0.009
$t_{1/2}/\text{min}$	11.77 ± 2.32	9.53 ± 2.19
$\text{AUC}/\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}$	5311 ± 1324.6	4909.5 ± 1110.4
$\text{CL}/\text{mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$	132.7 ± 23.3	145.3 ± 28.7
$V_d/\text{ml} \cdot \text{kg}^{-1}$	2155 ± 413	1895 ± 355

3 讨论

辣椒碱的紫外响应值相对荧光来说较低,与岛津 SPD-10A 检测器在 310 nm 检测相比,辣椒碱的检测限比本实验用的荧光检测器检测限约低 40 倍,为提高检测精度,本试验选用荧光检测器,其检测限约

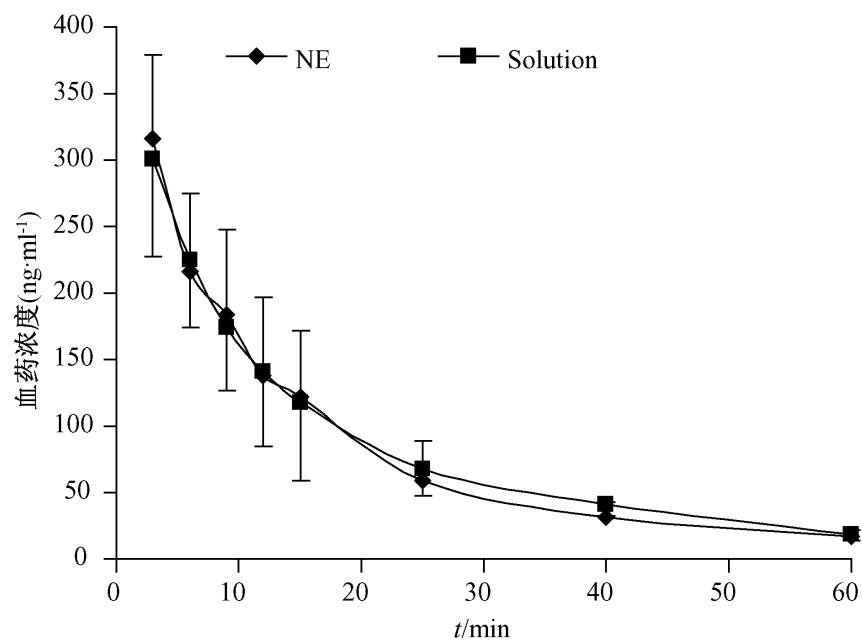


图 2 血药浓度-时间曲线

为 $4.9 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

文献报道纳米乳可以改变药物的药物代谢动力学参数^[4],但本试验表明,辣椒碱纳米乳与溶液的药代动力学参数经 t 检验无显著性差异 ($P > 0.05$)。其原因可能是本实验给药方法为注射给药,纳米乳量相对血液容量来说量是很少的,进入血液后它可迅速在血液内均匀分布,因此它基本上不改变药物的体内的代谢半衰期。

文献报道辣椒碱溶液 $t_{1/2}$ 为 $12.44 \pm 20.3 \text{ min}$, AUC 为 $17.78 \pm 4.45 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{[3]}$,约为本文的 AUC 值的 3.34 倍。其原因可能有两方面。其一为文献给药剂量为本文的两倍,而按单室模型处理时 AUC 与给药剂量成正比;其二为文献所用动物为新西兰大白兔,本文所用动物为普通家兔,可能存在一定的种属差异。

[参考文献]

- [1] Long X Y, Luo J B, Yan Z H, et al. Preparation and in vitro & in vivo evaluations of topically applied capsaicin transfersomes [J]. *Pharmaceutical Sinica*, 2006, 41 (5): 461.
- [2] Kawada T, Watanabe T, Katsura K, et al. Formation and metabolism of pungent principle of capsicum fruits. Microdetermination of capsaicin by highperformance liquid chromatography with electrochemical detection [J]. *J Chromatogr.*, 329 (1985) 99.
- [3] Fang J Y, Wu P C, Huang Y B, et al. In vivo percutaneous absorption of capsaicin, nonivamide and sodium nonivamide acetate from ointment bases Pharmacokinetic analysis in rabbits [J]. *Int J Pharm*, 1996, 128: 169.
- [4] 于巍,王春龙,赵广荣. 微乳给药系统研究进展. *医药导报*, 2006, 25 (11): 1177.

[责任编辑 顾雪竹]