

外敷中药中冰片的在体透皮吸收定量分析

何玉梅^{1*}, 何敏², 许丽萍¹, 张云安¹, 朱宏¹, 李佩文³

(1. 武警总医院中医科, 北京 100039; 2. 成都生物制品研究所, 成都 610023;
3. 中日友好医院中医肿瘤科, 北京 100029)

[摘要] 目的: 探讨外敷中药消水 II 号中冰片在人体的透皮吸收行为和药时关系。方法: 以冰片作为消水 II 号的有效标识成分, 采用气相色谱法测定了消水 II 号在癌性胸水患者胸部敷药后不同时间的胸水液中的冰片含量。结果: 给药后 2 h 测得患者胸水中冰片含量为 236 ng/mL, 随着时间延长, 胸水中的冰片含量增加, 在敷药 36 h 测出胸水中的冰片含量最高, 达 2 425 ng/mL, 以后则逐渐降低。结论: 消水 II 号可在人体透皮吸收, 其中冰片在人体的透皮吸收具有缓释、长效的特点。

[关键词] 中医外治法; 在体透皮吸收; 定量分析; 冰片; 气相色谱法

[中图分类号] R945 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2006)12-0015-04

Determination Percutaneous Absorption in vivo of the Recipe of Eliminating Pleurorrhea II

HE Yu-mei^{1*}, HE Min², XU Li-ping¹, ZHANG Yun-an¹, ZHU Hong¹, LI Pei-wen³

(1. The General Hospital of Armed Police Forces Beijing 100039, China;
2. Chengdu Institute of Biological Product 610023, China;
3. The China-Japan Friendship Hospital Beijing 100029, China)

[Abstract] **Objective:** To analyse the percutaneous absorption of borneol in the recipe of eliminating Pleurorrhea II. **Methods:** borneol in the effusion sample was determined by gas chromatography. **Results:** after 2 h borneol of 236 ng/mL was determined in effusion, the concentration of borneol went up slowly in the pleurorrhea sample. Till 36 h borneol reached the peak value 2 425 ng/ml. **Conclusion:** The recipe of eliminating Pleurorrhea II can be absorbed via skin, it is distributed through chest skin slowly and maintained high level in the pleurorrhea.

[Key words] external treatment of Chinese traditional medicine; percutaneous absorption in vivo; analyse in quantity; borneol; gas chromatography

1 材料和方法

1.1 病例选择 1997 年 10 月至 1999 年 12 月在中日友好医院肿瘤科住院治疗病人, 有病理学、影像学或临床学诊断依据, 出现了明显的胸水; 患者一般情况尚可, 卡氏评分在 40 分以上, 能耐受穿刺放液; 观察期间未用其它与本治疗有关药物的初治患者, 共观察 6 人。

1.2 取材检测方法 及实验结果 B 超定位处行穿

刺置管术, 从胸腔引流积液。同时在胸壁皮肤上外敷消水 II 号约 20 mL, 纱布和保鲜膜覆盖, 胶布固定。敷药后 24 h 撤下药膏, 并于给药 30 min、1 h、2 h、4 h、8 h、12 h、24 h、48 h、72 h 分别抽取 20 mL 胸水, 加入 50 μ L 内标萘溶液和 60 mL 蒸馏水, 用水蒸汽蒸馏法提取 1 h, 收乙酸乙酯层, 氯仿萃取并定容至 2 mL 进样 5 μ L 检测。

1.2.1 仪器与试剂 岛津 GC-7AG 气相色谱仪, G-E1B 微处理机, R-112 记录仪; 对照品冰片购自中国药品生物制品检定所, 批号 743-8902; 内标物萘为上海试剂一厂产品, 批号 92-03-01; 乙醇, 氯仿, 乙酸乙

[收稿日期] 2006-01-04

[通讯作者] * 何玉梅, Tel: (010) 88276709

酯均为分析纯。

1.2.2 色谱条件 色谱柱: 不锈钢柱(3×200 mm); 固定相: 15% DEGS/ ChromosorbWAW80-100 目; 氢火焰离子检测器; 气化和检测温度分别为 180 ℃、150 ℃; 空气 0.5 kg/cm²; 氢气 0.6 kg/cm²; 氮气 40 mL/min; 灵敏度 10²; 衰减 16; 纸速 2.5 mm/min; 全程分析时间 30 min, 冰片保留时间约为 7 min 及 8 min, 萘保留时间约为 12 min。

1.2.3 标准液配制 准确称量冰片对照品 0.1018 g, 置 25 mL 量瓶内, 以氯仿定容至刻度, 摇匀, 即得 0.4072% 的冰片母液。准确量取母液 10 mL, 置 250 mL 容量瓶中, 以氯仿定容至刻度, 摇匀, 即得 0.01629% 的冰片工作液, 母液及工作液均密封, -4 ℃ 保存。

1.2.4 内标液的配制 准确称量萘 0.2566 g, 置 10 mL 容量瓶内以氯仿定容至刻度, 摇匀, 得 2.566% 的内标母液。准确量取内标母液 1 mL, 置 10 mL 容量瓶内, 用氯仿定容至刻度, 摇匀, 得 0.2566% 的内标工作液, 母液及工作液密封后, -4 ℃ 保存。

1.2.5 供试生物样品的制备 在敷药的 0 时间、1 h、2 h、4 h、8 h、12 h、24 h、36 h、48 h、72 h 用 50 mL 注射器抽腹水 20 mL, 置干净的 250 mL 烧瓶中, 准确量取 50 μL 内标萘工作液加入, 然后量取约 80 mL 蒸馏水于烧瓶内, 挥发油提取器中加入适量蒸馏水, 并量取 1 mL 乙酸乙酯沿管壁加入, 用水蒸汽蒸馏法加热提取, 充分提取 1 h 后收乙酸乙酯层, 氯仿冲洗提取器并定容至 2 mL, 加适量无水硫酸钠脱去样品中的水, 以备检测。

1.2.6 生物样品标准曲线 取人空白腹水各 20 mL, 置玻璃瓶内, 各加入内标萘工作液 50 μL, 冰片工作液 0.1 mL、0.2 mL、0.4 mL、0.6 mL、0.8 mL、1 mL, 按上述生物样品制备方法操作, 冰浴下定容至 2 mL, 吸取 5 μL, 注入气相色谱仪, 连续进样 3 次, 测定峰面积。以冰片与萘的峰面积比($A_i/A_s, Y$) 对冰片重量(X) 直线回归, 结果表明在 0.041~0.407 μg 范围内线性关系良好。

1.2.7 生物样品回收率 配制不同浓度的冰片生物样品, 吸取 5 μL 进样, 每份样品进 3 次, 得对照品冰片和内标萘的峰面积, 计算两者之比值, 将峰面积比值代入回归方程, 据标准曲线求出冰片含量, 再与已知加入的冰片含量相比, 计算回收率, 结果显示, 各点的回收率在 98.7%~105.1% 之间, 冰片平均回

收率为 100.86%。

表 1 生物样品标准曲线数据($n=3$)

对照品冰片 溶液含量(mL)	冰片重量 (μg, X)	对照冰片峰/内标萘峰 ($A_i/A_s, Y$)
0.1	0.04072	0.10207
0.2	0.08144	0.20493
0.4	0.16288	0.39790
0.6	0.24432	0.59563
0.8	0.32576	0.80352
1.0	0.40720	1.02956

回归方程: $Y = 2.5073X - 0.005223, r = 0.9996$

1.2.8 精密度的测定 配制不同浓度的冰片生物样品, 在不同日和一天内的不同时间进针, 每份样品进 5 μL, 共进 5 次, 作日内、日间精密度的实验, 得到冰片和萘的峰面积比值, 计算其平均值($\bar{x} \pm s$) 和相对标准误差(RSD%), 见表 2, 表 3。

表 2 生物样品日内精密度的测定($n=5$)

浓度(μg/μL)	峰面积比值均值	RSD%
0.0163	0.20444 ± 0.00133	0.649
0.0326	0.39368 ± 0.00255	0.648

表 3 生物样品日间精密度的测定($n=5$)

浓度(μg/μL)	峰面积比值均值	RSD%
0.0163	0.20598 ± 0.0011	0.537
0.0326	0.39850 ± 0.0026	0.652

由表 2, 表 3 可见生物样品的日内、日间精密度的标准偏差小于 1%。

2 结果(见表 5)

表 4 生物样品中冰片的校正因子

对照品冰片溶液含量(mL)	冰片重量(μg)	校正因子	校正因子均值
0.1	0.04072	1.244	1.256
0.2	0.08144	1.239	
0.4	0.16288	1.276	
0.6	0.24432	1.279	
0.8	0.32576	1.264	
1.0	0.40720	1.233	

据公式 $m_i/m_s = f \cdot A_i/A_s$ 求冰片的含量, 其中 m_i 和 A_i 表示对照品冰片的重量和峰面积, m_s 和 A_s 表示内标萘的重量和峰面积, f 为冰片的校正因子, 根据冰片线性关系考察的三批数据, 计算出 f 的结果。未用药的人空白胸腹水(见图 1), 加入内标萘的冰片标准品溶液后, 龙脑和异龙脑保留时间约为

6.67 min、7.88 min, 内标萘保留时间约 11.25 min, (见图 2)。

由表 5 和图 3 可以看出: 冰片透皮吸收后 2 h 可以在胸水中测到, 浓度约 236 ng/mL, 随着时间延长, 进入积液中的冰片含量缓慢增加, 在 24 h~ 36 h 冰片浓度达到峰值, 约为 2 425 ng/mL 左右, 以后缓慢下降, 84h 时积液中冰片浓度仍可测到, 约 319 ng/mL (见图 4, 5)。一次敷药 20 mL, 保留 24 h 后揭掉, 冰片在体腔积液内的浓度可维持 3 天, 表明消水 II 号外敷具有缓释、长效的特点。

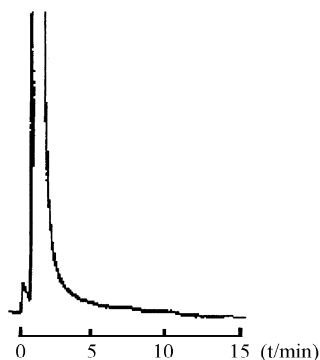


图 1 空白人胸水气相色谱图(敷药前, 0 时间)

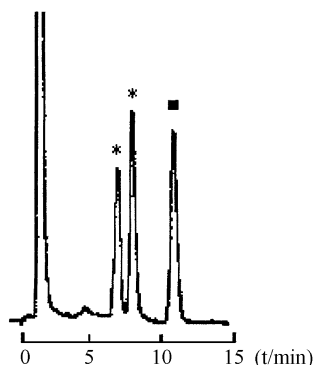


图 2 冰片标准品+ 内标萘(* 示冰片, ■示萘)

表 5 不同时间人胸水中冰片的含量 (n=6)

取样时间	冰片浓度 (ng/mL)
2 h	236 ± 28.3
4 h	541 ± 81.1
8 h	957 ± 136.8
12 h	612 ± 128.1
16 h	1 607 ± 305.3
24 h	2 239 ± 414.2
28 h	2 351 ± 343.2
32 h	2 198 ± 406.6
36 h	2 425 ± 480.1
40 h	1 971 ± 394.2
48 h	1 725 ± 331.2
54 h	1 814 ± 328.3
60 h	1 296 ± 226.8
72 h	645 ± 108.4
84 h	319 ± 55.2

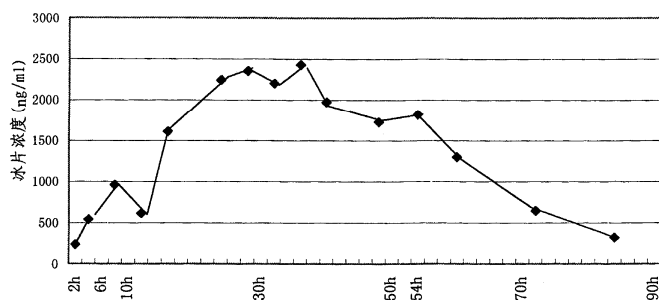


图 3 消水 II 号中的冰片透皮吸收的经时变化

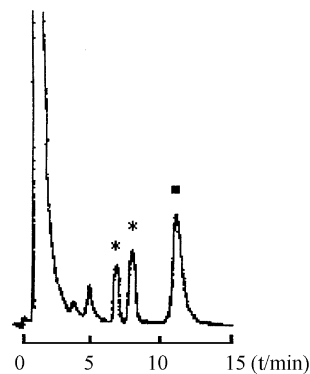


图 4 人胸水、气相色谱图

(* 示冰片, ■示萘敷药 20 h 之前)

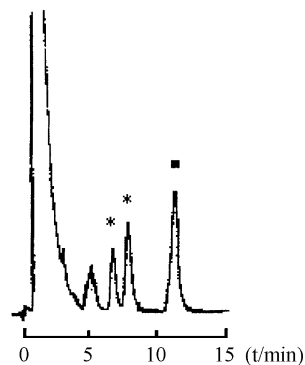


图 5 人胸水、气相色谱图

(* 示冰片, ■示萘敷药 20 h 之后)

3 讨论

消水 II 号是一个中药复方外用制剂, 透皮吸收研究是探讨中药外治法作用机理的重要内容。目前中药透皮吸收研究方法主要分 2 种: 体内透皮吸收测定法和体外透皮吸收测定法, 由于体内透皮吸收测定法所具有的难度, 现有文献报道绝大部分是采用离体透皮吸收测定法, 但离体透皮吸收测定法毕竟与体内透皮吸收测定法不同, 它无法真实反映药物的在体透皮吸收行为。鉴于此, 我们迎难而上, 选用体内透皮吸收测定法, 对消水 II 号中的标识成分之一冰片进行了透皮吸收的定性定量检测分析。结果证明 GC 法定量检测冰片是可行的, 目前尚未见用类似方法对冰片生物样品检测的报道, 本文在此领域进行了初步的探索, 从而为体内生物样品透皮吸收检测奠定方法学基础。

有关外用中药透皮吸收在体内的药代分布过程, 涉猎者少, 现有方法仅限于同位素示踪测定法, 还没有建立一种能用于临床推广, 方便使用的科学方法。在体透皮实验时, 用化学法, 甚至仪器法检测中药在体内的吸收情况难度很大, 因为中药成分复杂, 并非所有的成分都能足量透过皮肤, 加之体内的代谢分解, 要对方中所有的药物成分都进行透皮吸收检测, 是不可能的, 也很不现实, 真正药物有效成分的透皮吸收及其代谢产物测定的体内法研究目前还处于探索阶段^[1]。本实验用气相色谱法对消水 II 号膏中的冰片进行了经皮吸收检测, 得到了一些初步结果, 结合前期动物实验结果, 我们认为: 气相色谱法检测冰片的在体透皮吸收行为是可行的, 从侧面也表明消水 II 号是可以经皮吸收起效的。

动物实验开始用 HPLC 法对消水 II 号中的桂皮醛透皮后在小鼠血、腹水及组织中的含量进行了检测, 结果在腹水中测出了桂皮醛, 而血浆和组织中未能测到, 提示中药外敷透皮吸收具有明确的靶向性。对小鼠敷药后不同时间的血和腹水用 GC 法测量冰片含量, 表明冰片可在短时间内透皮进入血, 达到较高浓度并维持较长时间, 腹水中的浓度上升缓慢, 但达峰浓度高, 维持时间长。根据冰片在血和腹水中浓度变化趋势, 可以看出消水 II 号透皮吸收具有缓释、长效, 在靶器官浓聚的特点。由此推测消水 II 号透皮后可能绝大部分先通过毛细血管输送, 随血流向全身分布, 其中大部分到达靶部位——腹水中, 少部分可能通过组织渗透, 直接进入腹腔, 因而消水 II 号透皮给药腹水中药物浓度高, 维持时间长, 血中浓度低, 维持时间短。提示经皮给药有一定靶向性, 透皮进入体内的药物大部分直接到达病变部位, 在靶组织浓聚起效, 进入全身循环(非病变部位)的药量很少, 进一步证明了陈百先等^[2]经穴位透皮给药的结论。这对肿瘤治疗具有重要意义, 启发我们对某些功能活性强、但毒性大的药物如通过皮肤给药可望减轻或避免其毒副作用, 从而提高疗效。

关于中药外用的剂量, 一般未作特殊限制, 长期以来中药外治法的敷药时间、间隔时间均凭经验, 尚未见这方面深入的实验研究报道, 本课题在此方面得出了一些初步结果。临床取胸腹水患者敷用消水 II 号后不同时间的体腔积液, 经透皮吸收检测不仅

证明冰片能透过人体皮肤, 到达靶器官; 还找到了消水 II 号临床给药剂量的科学依据: 单次给药 20 mL, 24 h 后揭掉药膏, 36 h 胸水中浓度达到峰值, 到 84 h 仍能测出冰片含量, 证明消水 II 号临床给药也具有缓释、长效的特点, 提示消水 II 号单次给药 20 mL, 药物在体内浓度可维持三天以上, 所以临床不必每天敷药, 正确的给药方法应是: 敷药 36 h 后停药, 休息一天再敷药。这样有利于维持体内稳定的血药浓度, 提高药物的生物利用度, 不仅临床疗效提高, 还减少了给药次数, 节省了药材用量。避免了患者因忘记服药而产生的血药浓度峰谷变化。

临床观察还发现: 部份患者首次给药后疗效明显, 以后如每天连续给药反而疗效降低, 如果隔两天后再给药, 又出现了疗效: 动物实验中也证明消水 II 号的药效无剂量依赖性, 即浓度差异。这可能与皮肤吸收具有饱和性有关^[3], 因为药物通过皮肤的渗透是被动扩散过程, 随着皮肤表面层药物浓度增加, 渗透速率增大, 但药物的透皮速率并非随着药物浓度的提高而无限增大, 固定皮肤面积上吸收总量是有限的。另外, 还与皮肤表面的受体调整机制失常有关^[4], 药物对机体发生作用的基础, 绝大多数是药物先与机体中某些特殊靶体相结合, 再通过影响靶体产生药效。这种能与药物结合并发生效应的靶体即“广义的受体”。大量使用外敷药后, 皮肤表面的受体因与药物过量结合而处于僵化状态, 亲和力大幅度下降, 称为无效受体, 以致再次用药时药效减弱, 出现“脱敏”现象, 因而药物疗效降低。所以今后如能将消水 II 号中的有效成分提取出来, 舍去其中的大量杂质, 增加有效成分含量, 制成方便临床使用的剂型, 疗效将进一步提高。

[参考文献]

- [1] 孙考祥, 徐凯建, 张亚萍. 中药透皮吸收研究概况[J]. 中国药学杂志, 1996, 31(1): 13.
- [2] 陈百先, 潘金友, 吴自荣, 等. 穴位经络给药途径的动物实验研究[M]. 当代中医外治精要. 中国中医药出版社, 1996. 49.
- [3] 于秀路, 杜步云, 李承明, 等. 新编外用药物手册[M]. 济南: 山东科学技术出版社, 1996. 6.
- [4] 李家泰. 临床药理学[M]. (第二版). 北京: 人民卫生出版社, 1998. 195-199.