

· 论著 ·

基于微透析技术的苦参碱凝胶经皮给药的药动学研究

顾清, 周剑斌, 徐剑良, 朱国花, 舒薇 (上海市静安区闸北中心医院药剂科, 上海 200070)

[摘要] **目的** 建立同步测定经皮给药制剂在皮肤、血液中药动学的方法, 研究苦参碱凝胶在体内的药动学行为。**方法** 应用经体外和体内回收率校正建立的基于微透析探针的皮肤血液双位点同步微透析系统, 通过在皮肤和颈静脉植入探针, 在大鼠腹部脱毛部位给予苦参碱凝胶, 连续收集探针中 12 h 的透析液, 并采用 LC-MS 微量检测技术测定探针透析液中的药物浓度。**结果** 本研究成功构建了双位点同步微透析药动学评价系统, 大鼠皮肤给予苦参碱凝胶后, 皮肤中的药物浓度、AUC 值、半衰期均显著高于血液中药物浓度。**结论** 本研究建立的微透析结合 LC-MS 的取样及检测技术为经皮给药制剂的药动学研究提供了新的技术平台。

[关键词] 苦参碱; 微透析; 经皮给药; 药动学

[中图分类号] R541 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2019)06-0503-05

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2019.06.006

Pharmacokinetics study on matrine gels based on micro dialysis

GU Qing, ZHOU Jianbin, XU Jianliang, ZHU Guohua, SHU Wei (Department of Pharmacy, Central Hospital of Shanghai Zhabei District, Shanghai 200070, China)

[Abstract] **Objective** To establish a pharmacokinetic method for simultaneous determination the drug concentration in the skin and blood for transdermal formulations, and to study the absorption and metabolism of matrine gel in vivo. **Methods** A micro dialysis probe-based skin-blood synchronous micro dialysis system was established. After the probe was implanted into the skin and jugular vein, the matrine gel was administered. The dialysate in the probe was continuously collected for 12 h. The concentration of the drug in the probe dialysate was determined by LC-MS. **Results** In this study, a two-site synchronous micro dialysis pharmacokinetic evaluation system was successfully established. After given matrine gel, the concentration, AUC and half-life of the drug in skin were significantly higher than that in blood. **Conclusion** The established micro dialysis system combined with LC-MS could provide a new technology platform for the pharmacokinetic study on transdermal formulations.

[Key words] matrine; micro dialysis; transdermal delivery systems; pharmacokinetics

苦参碱(matrine)为豆科植物苦参 *Sophora flavescens* Ait.、苦豆子 *S. alopecuroides* L.、广豆根 *S. subprostrata* Chun et T. Chen 等中药的活性成分, 具有抗炎、抗过敏、镇痛、抗心率失常、抗肝纤维化、抗肿瘤、抗病毒及免疫抑制等药理活性^[1-3]。苦参碱单用或与其他药物配伍外敷, 对于湿疹、神经性皮炎、银屑病等疾病具有良好的治疗效果^[4]。

微透析(MD)是一种新的生物取样技术^[5]。在经皮微透析技术中, 微透析探针具有“人造血管”的特点, 探针植入皮下并与体内的药物达到平衡后可直接反映皮肤中的药物浓度。与传统的药动学分析方法相比, 经探针透析膜过滤的透析液“信号分子”

可以更加客观地反映组织中的药物代谢情况; 且对皮肤几乎无损伤。该技术具有在体(in vivo)、原位(in situ)取样和能够在线(on line)、实时(real time)检测的优点, 使其特别适用于药物经皮吸收研究^[6-7]。

本研究利用增量法(Gain法)和减量法(Loss法)校正皮肤线性探针和血液同心圆探针的体内回收率, 建立可同步反映皮肤和血液中药浓度的微透析系统, 并结合 LC/MS 分析技术, 研究苦参碱凝胶经皮给药制剂在皮肤和血液中的药动学过程。

1 实验材料

1.1 仪器

Agilent 6410 Triple Quad LC/MS 系统(美国 Agilent 公司); 磁力搅拌器(予华仪器有限责任公司, 郑州)。

微透析设备(BAS 公司, USA), 包括: 灌注器

[基金项目] 上海市卫生和计划生育委员会基金项目(20124081)

[作者简介] 顾清, 主管药师, 研究方向: 中药临床药学, Email: guqing999@126.com

[通讯作者] 舒薇, 主任药师, Email: shuwei666@126.com

推进泵(Baby Bee Syringe Drive, MD1001)、灌注器(1 ml Bee Stinger Gastight Syringer, MD0100)、灌注器架(Bracket for Baby Bee, MD1002)、流速控制器(Work Bee Controller, MD1000, MD-1020);磷酸盐缓冲溶液(PBS, pH7.4)含 Na_2HPO_4 3.191 g/L、 NaH_2PO_4 0.775 g/L、 NaCl 5.58 g/L;线性探针(膜长 20 mm,膜截留相对分子质量:5000 000)、同心圆探针(自制,膜长 10 mm,膜截留相对分子质量:5000 000);实验动物保温垫(自制)。

1.2 试剂

苦参碱对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110805-201709);苦参碱原料药(西安华萃生物技术有限公司,纯度 98%,批号:SH20170120);磷酸可待因对照品(中国食品药品检定研究院,批号:171203-201706);苦参凝胶(贵阳新天药业股份有限公司); $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (广东金砂化工厂,分析纯); $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (广东金砂化工厂,分析纯); H_3PO_4 (苏州振亚化工厂,分析纯);甲酸胺(美国 Sigma 公司,色谱纯);乙腈(德国 Merck 公司,色

谱纯);水为三蒸水。

1.3 实验动物

SD 大鼠,雄性,体重:180~220 g(海军军医大学实验动物中心,SPF 级,动物合格证号:SYXK(沪)2017-0002)。

2 方法和结果

2.1 色谱与质谱条件

色谱条件:色谱柱:Agilent SB C_{18} 柱(2.1 mm \times 50 mm, 3.5 μm);流动相:甲醇-25 mmol/L 甲酸胺(75:25, V/V);流速:0.3 ml/min;柱温:40 $^{\circ}\text{C}$;检测波长:220 nm;进样量:5 μl ;运行时间:2 min;

质谱条件:离子源:ESI 源;辅助雾化气(N_2)压力:40 psi;毛细管电压:4 000 V;干燥气(N_2)温度:350 $^{\circ}\text{C}$;流量:10 L/min;正离子模式检测;扫描方式为多反应监测(MRM);碰撞诱导解离电压(CID):35 eV(苦参碱)、28 eV(内标可待因);用于定量分析的离子反应分别为: m/z 249 \rightarrow 148(苦参碱)和 m/z 300 \rightarrow 215(可待因);碰撞能量:20 eV。

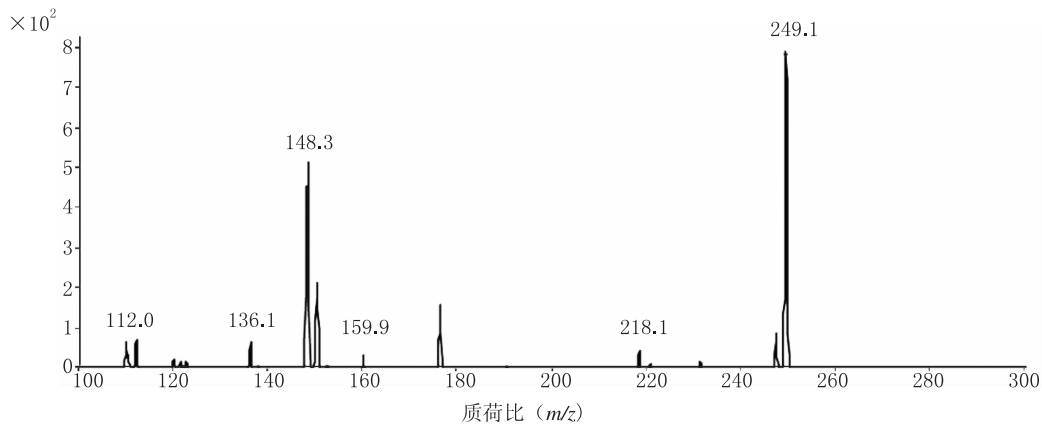


图 1 苦参碱 LC-MS 离子扫描质谱图

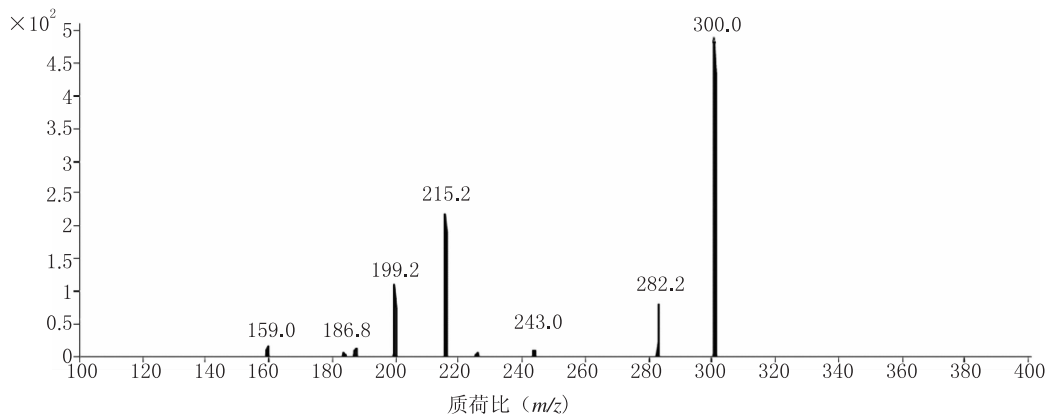


图 2 可待因 LC-MS 离子扫描质谱图

2.2 标准曲线及方法学考察

2.2.1 标准曲线的制备

分别精密称取苦参碱、可待因对照品(内标)适

量,置于容量瓶中并定容,配制成浓度分别为 3、1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的母液,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱冷藏。精密吸取适量的苦参碱和可待因母液,并用 PBS 将苦参碱稀释至

1、5、10、50、100、500、1000 ng/ml 的系列浓度(每个样品中可待因含量均为 20 ng/ml,按上述 LC/MS 条件依次进样。以面积(A)对浓度(C)进行线性回归,得回归方程 $A = 0.0897C - 2.344$, $r = 0.9999$ 。结果表明,苦参碱浓度在 1~1 000 ng/ml 范围内,吸收峰面积与浓度的线性关系良好。

2.2.2 精密度实验

取低、中、高浓度分别为 10、100、500 ng/ml 的苦参碱对照品溶液,分别于日内 0、4、8、12、24 h 和日间 1、2、3 d 按照“2.1”项下 LC/MS 条件进样测定,并记录苦参碱的吸收峰面积。日内精密度 RSD 分别为 2.70%、1.79%、0.75% ($n=6$),日间精密度 RSD 分别为 3.55%、2.46%、1.45% ($n=6$),结果表明本方法精密度良好。

2.2.3 稳定性考察

取浓度为 100 ng/ml 的苦参碱参比溶液,分别于 0、2、4、6、8 h 进行 LC/MS 检测,各时间点的吸收峰面积结果依次为 661、662、660、657、659,不同时间点的吸收峰面积相对标准偏差 RSD 值为 0.29% ($n=6$),表明样品溶液在配制后 8 h 内具有良好的稳定性。

2.2.4 加样回收率实验

精密量取浓度为 10、100、500 ng/ml 的苦参碱标准品溶液,并将以上 3 种浓度的标准品溶液分别加入到已知浓度的苦参碱样品溶液中,测定混合溶液中苦参碱的总浓度,并计算样品的加样回收率。平均回收率分别为 97.23%、98.76%、101.25%,RSD 值分别为 2.88%、2.24%、1.29%。结果表明苦参碱回收率良好,样品测定的准确度符合方法学验证的要求。

2.3 线性和同心圆探针的体外回收率

分别采用增量法和减量法探究药物浓度对两种探针的体外回收率影响。根据预试验,将灌流液的灌注速度设为 2 μ l/min。

2.3.1 皮肤线性探针体外回收率

增量法测定回收率:将皮肤线性探针的半透膜完全浸入到温度为 $(37 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 、转速为 200 r/min 的苦参碱磷酸缓冲盐(PBS)溶液($C_{in} = 10、20、50$ ng/ml)中。以 PBS 平衡探针 1 h 后开始收集探针透析液,每次收集体积为 40 μ l,连续收集 5 次。根据“2.1”项下条件测定透析液中药物浓度 C_{out} 。线性探针体外增量法回收率(RG%)的计算公式(1)如下:

$$RG\% = C_{out}/C_{in} \times 100\% \quad (1)$$

减量法测定回收率:将皮肤线性探针的半透膜

完全浸入到温度为 $(37 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 、转速为 200 r/min 的 PBS 溶液中。分别以灌流速度为 2 μ l/min 苦参碱 PBS 溶液($C_{in} = 10、20、50$ ng/ml)为灌流液,探针经灌流液平衡 1 h 后,每 20 min 收集一次透析液,并连续收集 5 次。根据“2.1 项”LC/MS 条件测定透析液中的药物浓度 C_{out} 。线性探针体外减量法回收率(RL%)按照公式(2)计算:

$$RL\% = (C_{in} - C_{out})/C_{in} \times 100\% \quad (2)$$

线性和同心圆探针的 RG 和 RL 的体外回收率结果如表 1 所示。

表 1 皮肤线性探针体外回收率($n=5$)

浓度(ng/ml)	回收率(%)	
	增量法	减量法
10	70.5 \pm 1.4	72.2 \pm 1.1
20	73.4 \pm 1.9	75.8 \pm 1.6
50	75.1 \pm 2.2	76.6 \pm 2.1

2.3.2 血管同心圆探针体外回收率

增量法测定回收率:将血液同心圆探针的半透膜完全浸入苦参碱 PBS 溶液($C_{in} = 50、100、200$ ng/ml)中。其余测定同“2.3.1”项下增量法测定回收率操作。

减量法测定回收率:将血液同心圆探针的半透膜完全浸入 PBS 溶液中。分别以灌流速度为 2 μ l/min 苦参碱 PBS 溶液($C_{in} = 50、100、200$ ng/ml)为灌流液。其余测定同“2.3.1”项下减量法测定回收率操作。同心圆探针的体外回收率结果如表 2 所示。

表 2 血管同心圆探针体外回收率($n=5$)

浓度(ng/ml)	回收率(%)	
	增量法	减量法
50	28.4 \pm 2.3	24.2 \pm 1.8
100	31.7 \pm 1.8	25.1 \pm 2.5
200	29.1 \pm 0.5	27.1 \pm 0.9

表 1、表 2 的体外回收率结果显示,以不同浓度的药物作为灌流液或探针所处不同药物浓度中,采用增量和减量两种方法测定的线性和同心圆探针体外回收率基本一致,表明苦参碱的浓度对以上两种探针的体外回收率无显著性影响。

2.4 线性和同心圆探针的体内回收率

2.4.1 手术方法

在实验前 24 h 先将大鼠的腹部脱毛处理,用 25%乌拉坦麻醉大鼠,麻醉给予量为:0.4 ml/100 g(ip),大鼠麻醉后,将其固定于保温垫上(37.5°C 左右)。线性探针植入皮下的方法:在 18G 穿刺针引

导下将线性探针半透膜埋入皮下。同心圆探针埋入颈静脉方法:在大鼠颈部剪开1 cm左右的小口,用镊子将颈静脉钝性分离,并将静脉远心端结扎,将同心圆探针插入血液充盈的血管,并用手术线将探针和静脉固定,最后缝合伤口,消毒。

2.4.2 皮肤探针的体内回收率校正

在穿刺针的引导下将线性探针的半透膜埋入皮下,用10、20、50 ng/ml(C_m)苦参碱的PBS溶液以2 μ l/min的速度进行灌注。灌注平衡1 h后开始收集皮肤组织透析液,单次收集量为40 μ l,并连续收集5次并测定组织透析液中的药物浓度。皮肤探针的RL%结果如表3所示。

表3 皮肤线性探针体内回收率($n=5$)

浓度(ng/ml)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
10	44.8 \pm 2.5	42.70	2.4
20	40.9 \pm 3.5		
50	42.4 \pm 2.2		

2.4.3 同心圆探针体内回收率的校正

按照“2.4.1”项下手术方法将同心圆探针置于颈静脉,按照“2.3.2”项下体外回收率的测定方法,分析灌注液浓度对同心圆探针体内回收率的影响,利用公式(2)计算同心圆探针的体内回收率(RL%)。结果如表4所示。

表4 血管同心圆探针体内回收率($n=5$)

浓度(ng/ml)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD
50	26.4 \pm 1.8	25.0	1.9
100	24.1 \pm 2.1	20.0	24.4 \pm 1.7

体内回收率实验结果(表3、4)显示,线性探针、

同心圆探针在以不同浓度的苦参碱进行灌注得到的体内回收率(RL%)之间无显著性差异,表明药物浓度对回收率影响较小,经不同灌注浓度处理的探针回收率之间无显著性差异。

皮肤线性探针和血液同心圆探针的体内平均RL%分别为(42.7 \pm 2.4)%和(25.0 \pm 1.9)%;同种探针的体外回收率(RG%和RL%)结果基本一致,因此可以采用体外增量回收率(RG%)和减量回收率(RL%)的校正系数以及体内减量回收率(RL%)计算两种探针的体内增量回收率(RG%),并利用校正的体内回收率($R_{in vivo}$)和测得的皮肤组织和血液透析液浓度($C_{dialysis}$)换算体内药物的真实浓度(C),计算公式如公式(3)所示。

$$C = C_{dialysis} / R_{in vivo} \quad (3)$$

2.5 苦参碱凝胶在皮肤、血液中的药动学^[8-10]

将SD大鼠腹部脱毛,待皮肤恢复24 h后,根据“2.4.1”的手术方法将线性探针植入皮下、将同心圆探针植入颈静脉中,建立可同时分析药物在皮肤和血液中药动学过程的皮肤-血液双位点同步微透析系统。以速度为2 μ l/min的PBS平衡探针1 h,于大鼠腹部给予3%苦参碱凝胶,并用聚乙烯薄膜覆盖,给药剂量:4.5 mg/cm²,给药面积:3 \times 4 cm²。在给药后收集透析液,以收集40 μ l为一个样品收集间隔,并进行定量,并连续收集12 h。根据公式(3)换算成其在皮肤组织液和血液中的实际药物浓度。苦参碱在皮肤和血液中的药物浓度-时间曲线如图3、4所示。使用Kinetic5.0软件分析在给药部位(皮肤)和全身(血液)中的药动学参数,结果如表6所示。

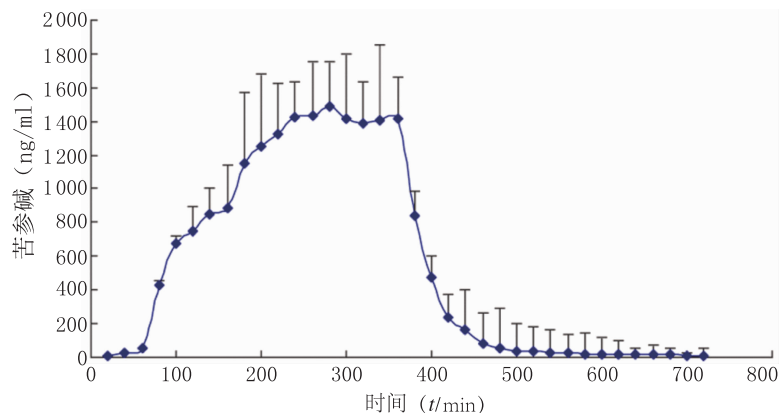


图3 皮肤中苦参碱浓度-时间曲线图

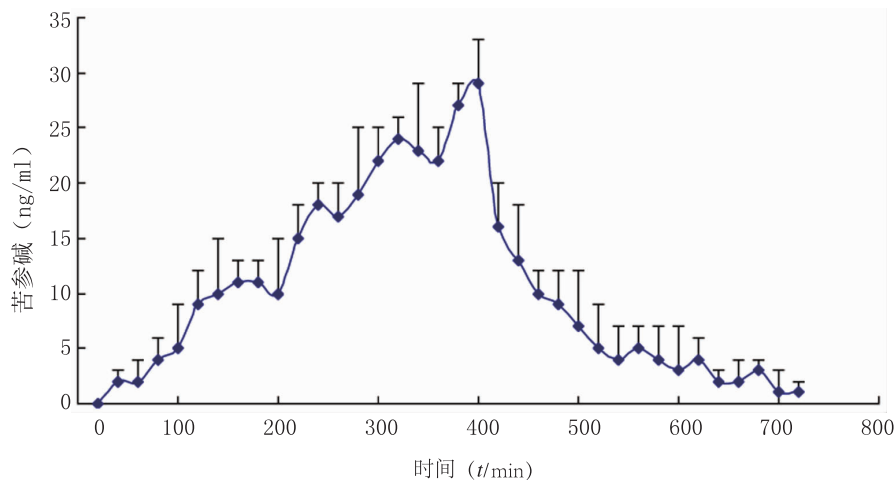


图4 血液中苦参碱浓度-时间曲线图

表6 经皮给药后苦参碱在皮肤和血液中的主要药动学参数

参数	皮肤	血液
$t_{1/2}$ (min)	485.1±26.5	611.6±21.5
t_{max} (min)	280.0±13.1	400.0±14.1
C_{max} ($\mu\text{g/ml}$)	1486.5±19.2	29.4±6.0
$AUC_{0 \rightarrow 720}$ ($\text{ng} \cdot \text{min/ml}$)	19416.0±40.1	369.4±12.4
$AUC_{0 \rightarrow \infty}$ ($\text{ng} \cdot \text{min/ml}$)	20745.0±57.8	405.6±17.8

药动学结果显示,皮肤给予苦参碱凝胶后,皮肤中的药物浓度显著高于血液中的浓度,且皮肤中的药物浓度变化更加平稳,间接反映出苦参碱凝胶制剂良好的透皮能力和局部治疗效果。

3 讨论

微透析技术可直接对细胞外液进行采样,广泛应用于动物和人体药动学研究。可以同步检测药物在不同身体部位的代谢过程,具有传统药动学分析方法不可比拟的优势。然而,其在中药透皮递药系统的药动学研究中应用并不广泛。课题组建立皮肤-血液双位点同步微透析系统,并用于研究苦参碱在皮肤组织和血液中的吸收和代谢情况。通过体外和体内评价,探讨了微透析系统结合 LC/MS 技术分析苦参碱药动学的可行性。

微透析探针的体内和体外回收率是该方法真实反映体内药物浓度的关键。灌注液的灌注速度、组织温度、取样部位、待测药物理化性质、透析膜以及药物与透析膜的化学交互作用等均可影响微透析探针的回收率。微透析探针的体外相对回收率受到透析膜内外浓度差形成的扩散、清除等影响;而影响体内回收率的因素更多,包括动物间的个体差异、血管探针插入颈静脉的深度,探针半透膜与血液的接触面积等^[11]。本研究建立的皮肤-血液双位点同步微

透析技术可以较好地解决这一问题,获得满意的回收率,可用于苦参碱凝胶的药动学研究。

【参考文献】

- [1] 张明发,沈雅琴. 苦参碱抗炎和免疫抑制药理作用的研究进展[J]. 抗感染药学,2018,15(5):737-743.
- [2] 张明发,沈雅琴. 苦参碱类生物碱抗病毒的临床药理作用研究进展[J]. 抗感染药学,2018,15(2):185-191.
- [3] 周峰,蔡鑫君,倪坚军,等. 苦参碱类药物新型给药系统研究进展[J]. 浙江中西医结合杂志,2015,25(7):710-713.
- [4] 刘梅,刘雪英,程建峰. 苦参碱的药理研究进展[J]. 中国中药杂志,2003,28(9):801-804.
- [5] ZHANG Y T, ZHANG K, GUO T, et al. Transdermal baicalin delivery using diethylene glycol monoethyl ether-mediated cubic phase gel[J]. Int J Pharm, 2015, 479(1):219-226.
- [6] 王华富,许守涛,储卫华,等. 微透析技术在药学研究中的应用[J]. 海峡药学,2018,30(10):30-33.
- [7] 杨盟,杨帝顺,顾永卫,等. 基于皮肤、血液双位点同步微透析技术的雷公藤甲素纳米乳体内药动学研究[J]. 中国药理学杂志,2018,53(11):894-899.
- [8] GU Y W, TANG X M, YANG M, et al. Transdermal drug delivery of triptolide-loaded nanostructured lipid carriers: Preparation, pharmacokinetic, and evaluation for rheumatoid arthritis[J]. Int J Pharm, 2019, 554:235-244.
- [9] 刘继勇,韩盈,胡晋红,等. 基于微乳凝胶新载体的丹皮酚经皮给药系统的构建及药代动力学研究[J]. 药学学报,2012,47(2):244-249.
- [10] YANG M, GU Y W, YANG D S, et al. Development of triptolide-nanoemulsion gels for percutaneous administration: physicochemical, transport, pharmacokinetic and pharmacodynamic characteristics [J]. J Nanobiotechnology, 2017, 15(1):88.
- [11] 蒋阿梅,李娟,韩鑫玥,等. 微透析技术研究蒙脱石镶嵌盐酸倍他洛尔微球混悬液在兔眼房水的药动学特征[J]. 广东药科大学学报,2019,35(3):327-332.

【收稿日期】 2019-06-12 【修回日期】 2019-10-24

【本文编辑】 李睿旻