

彝族药伤益气雾剂中栀子苷透皮吸收的动力学观察^{*}

□詹宏磊^{**} 王玉刚 (清华大学生命科学学院医学院药物药理研究室 北京 100084)
朱兆云 (云南省药物研究所 昆明 650111)
花 雷 (清华大学生命科学学院医学院药物药理研究室 北京 100084)
赵 毅 徐榕雪 (云南省药物研究所 昆明 650111)
雷 帆 杜力军^{**} (清华大学生命科学学院医学院药物药理研究室 北京 100084)

摘 要:目的:观察伤益气雾剂中栀子苷透皮吸收的特点,探讨伤益气雾剂外用时栀子苷的透皮吸收的动力学。方法:利用体内外实验对栀子苷透皮量及其血药浓度进行测试观察。结果:无论体内体外试验均表明,给药后半小时栀子苷即可透过皮肤,在皮下组织中分布,同时血中也能明显测到栀子苷。其透出量具有累积增多的线性关系。结论:伤益气雾剂中栀子苷可明显透过皮肤,并在皮下组织及血液中分布。本实验为该药外用治疗相关病症的应用提供了实验依据。

关键词:栀子苷 透皮吸收

doi: 10.3969/j.issn.1674-3849.2010.03.021

伤益气雾剂是依据彝族用药经验,由云南省药物研究所开发的具有自主知识产权的“国药准字”的上市药品。主要由栀子、七叶莲、玉葡萄根、白芨和薄荷脑等组成,具有消肿止痛、化瘀散结的作用,主要用于治疗跌打损伤等症。其中栀子为该药处方中主要药味之一。该药为清热解毒的常用药物,具有泻火除烦、清热利尿、凉血解毒的功效^[1]。现代药理研究表明,栀子具有较好的镇痛抗炎的作用^[2~4]。栀子苷(Geniposide)是栀子的主要活性成分之一,具有较强

的镇痛抗炎作用^[5]。因此,我们以栀子苷为测试成分,从体内外角度探讨伤益气雾剂皮肤给药后栀子苷透皮的动力学过程,以此探讨该栀子苷在复方体系下的透皮特点,以有助于探索伤益气雾剂的透皮特点,为该药的临床应用提供实验依据。

一、材料与方法

1. 实验动物

雄性 ICR 小鼠,购自北京维通利华实验动物中心,合格证号:SCXK(京) 2005-0003。实验室常规饲养(温度:20±2℃,相对湿度:60±5%)。适应 1 周后进行

收稿日期:2009-10-21

修回日期:2010-05-27

* 云南省科技厅科技创新强省计划(省院省校科技合作专项)(2008AD015):金品®系列彝族药作用机理的深入研究,负责人:朱兆云,杜力军,赵毅。

** 联系人:詹宏磊,博士研究生,主要研究方向:分子药理学,Tel:010-62796270,E-mail:zhanhl08@mails.tsinghua.edu.cn;杜力军,本刊编委,主要研究方向:药理学,Tel:010-62773630,E-mail:lijundu@mail.tsinghua.edu.cn。

实验,小鼠体重范围为 25~28g。

2. 仪器

Waters 高效液相色谱仪:600 泵,7725 进样阀,2487 双波长紫外检测器,Millenium32 工作站。色谱柱为 Zorbax SB-C₁₈ 反相柱(5 μ m,4.6mm $\times$ 150mm,Agilent 公司)。旋涡混合器(江苏太仓通讯器材厂),TGL-16C 型高速离心机(上海安亭科学仪器制造厂),恒温水浴锅(北京医疗设备厂)。

3. 药品与试剂

栀子苷对照品购自中国药品生物制剂检定所,批号:110749-200613;甲醇和乙腈(色谱纯,北京化学试剂公司);双蒸水自制。伤益气雾剂原料药液由云南省药物研究所提供,批号:0907312,其中栀子苷含量为 0.103%(W/V)。

4. 实验方法

(1) 体外透皮给药与采样^[6-7]。

实验前 2 天,先用 25%Na₂S 皮肤脱毛。实验当天处死小鼠,取背部脱毛皮肤,去除皮下组织,保留角质层。将皮肤固定于扩散池的给药室与接受室之间,两室有效接触面积为 2.98cm²,接受室容积为 15mL。真皮一侧与接受液完全接触。接受液为生理盐水。取不同溶剂的样品溶液置于给药室,将其顶部密封后将扩散池放入水箱槽孔内,水浴温度 37℃平衡 15min,取接受室生理盐水 1mL 作为对照样品,在补入等体积生理盐水后开始计时。分别于 0.25、0.5、1、2、4、6h 时抽取接受室中液体 1mL,置于青霉素瓶中,然后立即向接受室补入 1mL 生理盐水。平行做 3 份,每实验样品上药液量为 5mL。

(2) 整体动物皮肤给药与采样^[8]。

取小鼠随机分为 4 组,每组 3 只。实验前 2 天,皮肤脱毛处理,具体操作同上。实验时取各组小鼠皮肤均匀定量定面积涂末受试药液。实验结束时眼眶静脉采血后即处死小鼠,迅速取涂末药液的皮下组织,称重后-20℃冻存备用。对照组涂沫等体积生理盐水,并分别于给药后 0.5、1、1.5h 各处死小鼠 1 只,以与相应时间点给药组小鼠对照。给药组小鼠采用累积给药,每 0.5h 给药 1 次,分别于给药后 0.5、1、1.5h 采样。实验各组给药和采样流程如表 1。

(3) 样品预处理。

取血浆 0.1mL,分别加入甲醇 1mL 沉淀蛋白,漩涡混合后以 1500rpm 离心 10min。上清

于 37℃水浴挥干后,加入 0.1mL 甲醇溶解残渣并转移至 EP 管内,15000rpm 离心 20min 后,取上清,进样 10 μ L。

取小鼠定量称重(湿重)的皮下组织 300mg 左右,加入甲醇 2mL 匀浆 1min,将匀浆液置于 10mL 玻璃试管内超声 30min,2500rpm 离心 15min,取上清置于青霉素瓶内,再取 2mL 甲醇洗涤残渣一遍,离心,合并上清,56℃水浴蒸干,甲醇 0.1mL 溶解残渣并转移至 EP 管内,15000rpm 离心 20min,取上清,进样 10 μ L。

(4) 测试指标表达。

药物经皮释放量(μ g $\cdot$ cm⁻²)^[9]:将测试样品代入线性方程计算得所采样时药物经皮药物释放量。体外实验以 μ g $\cdot$ cm⁻² 表示,整体实验以 μ g $\cdot$ g⁻¹ 组织湿重表示。

药物透皮释放速率(μ g $\cdot$ cm⁻² $\cdot$ h⁻¹)^[10]:

$$J=(C_n-C_{n-1})/(t_n-t_{n-1})$$

式中:J:各时间点药物经皮释放速度; C_n-C_{n-1} :相邻两采样浓度之差; t_n-t_{n-1} :相邻两采样时间间隔(单位为小时)。

药物经皮释放百分率(S_i)(%)=所测时间点经皮释放量/给药总量 $\times$ 100%。

药物经皮累积释放百分率(S)(%)

$$S=\sum_{i=1}^n S_i$$

式中:S 为第 n 次取样时经皮累积释放百分率; S_i 为第 i 次取样的药物经皮释放百分率。

(5) 色谱条件。

经预试验并参照相关文献最终确定色谱条件为:柱温:25℃;流动相:乙腈:水(15:85);流速:1.0mL $\cdot$ min⁻¹;波长为 238nm;进样量 10 μ L。

(6) 色谱方法学考察。

①标准曲线的制备 取空白小鼠血浆,分别按 0.055、0.275、0.55、2.75、5.5 μ g $\cdot$ mL⁻¹ 的浓度加入栀子

表 1 实验设计流程

组别	时间(h)			
	0	0.5	1	1.5
	给药	第 2 次给药/处死	第 3 次给药/处死	处死
对照组	+	-/(1 只)	-/(1 只)	+(1 只)
伤益气雾剂	+	-/(3 只)		
伤益气雾剂	+	+/-	-/(3 只)	
伤益气雾剂	+	+/-	+/-	+(3 只)

注:“+”:实施;“-”:未实施。

苷对照品甲醇溶液,按样品预处理方法处理后,分别进样进行测定。以栀子苷($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)为纵坐标(Y),相应的峰面积为横坐标(X)作图,得曲线的回归方程为 $Y=5\times 10^{-5}X-0.0478$, $r^2=0.9998$ 。此方程用于计算血浆中栀子苷的含量。本法的小鼠血浆的最低检测限为 $0.01\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

②回收率与精密度 取空白小鼠血浆,分别加入 0.055 、 0.55 、 $5.5\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的栀子苷对照品甲醇溶液,按样品预处理方法处理,进行测定。结果与相应浓度的甲醇溶液比较,并计算回收率。取空白小鼠血浆,分别加入 0.055 、 0.55 、 $5.5\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的栀子苷对照品甲醇溶液,按样品预处理方法处理,进行测定。1日内连续测定3次,比较测定结果并计算日内精密度。连续测定3天每日测定1次,比较测定并计算日间精密度。

5. 数据处理

所得数据用 Excel 2003 软件处理,SPSS11.0 软件进行统计学检验。采用单因素方差分析,组间 t 检验。以 $P<0.05$ 为有统计学意义。

二、结 果

1. 色谱图及回收率与精密度

在上述方法中栀子苷分离良好,保留时间为 4.2min ,且在其出峰范围内没有干扰峰出现。回收率和精密度考察结果显示,栀子苷在血浆内的平均回收率为 69.84% ,日间和日内精密度相对标准差分别小于 7.99% 和 3.43% 。

2. 体外伤益气雾剂中栀子苷经皮药物释放数据 (见图 1~3)

图中可见 1h 内栀子苷释放速率呈线性,此后释放速率未见明显提高。使保持在同一水平上。

3. 整体动物给药后栀子苷经皮药物释放数据 (见图 4~6)

三、讨论与结论

栀子苷在药材、处方和血浆中的含量测定方法均有较多的报道^[11-13]。我们参考文献并结合具体实验确定了本实验条件下的栀子苷色谱条件。结果表明,栀子苷分离良好,且无杂峰干扰。

据文献报道^[14]栀子苷透皮在 $16\sim 48\text{h}$ 之内透皮较快, 60h 后透皮量减少。本实验所表现出的栀子苷透皮速率及透皮量明显高于文献报道,提示在伤益气雾剂给药体系中,其它成分具有促进栀子苷透皮的

协同作用。

体外透皮试验结果表明,给药后 30min 栀子苷即可有效的透过皮肤角质层,并随着时间的推移透出量不断增高。时-量回归方程为: $y=1.3072x+3.6104$ ($R^2=0.9645$)。从累积透出百分率来看, 6h 累积透出量占给药量的 $63.65\pm 16.04\%$ 。

以各采样点时间段所测量的栀子苷含量除以相应时间来观察药物在各时间段透皮速度,结果表明,伤益气雾剂在药后 1h 内,透皮速率与时间呈正相关性, 1h 后则透皮速率没有明显增加。

由于该药为外用药且主要用于治疗局部病变,因此,整体动物实验直接证明经皮给药后,皮下组织是否有药物透过是表明该药治疗皮肤病症的关键所在。为此,我们进行了相应的整体动物实验。经皮给药后 30min ,皮下即可测出栀子苷,其透出百分率(透出量/给药量)为 $14.77\pm 4.84\%$ 。连续给药第2和第3次皮下栀子苷透出百分率分别为 $16.49\pm 7.53\%$ 和 $16.52\pm 4.81\%$ 。各时间段释放速率无明显变化(图6)。

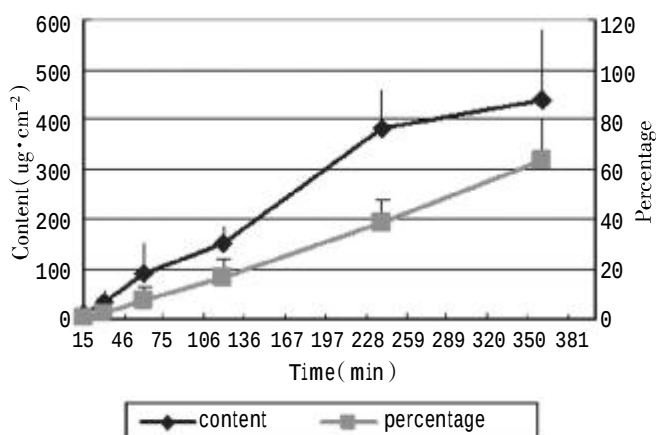


图1 体外实验伤益气雾剂中栀子苷累积经皮释放量及累积释放百分率($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

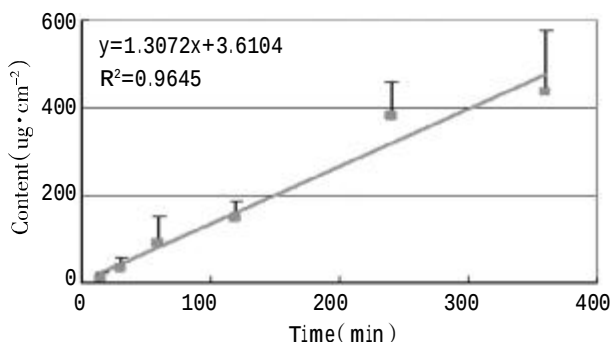


图2 伤益气雾剂中栀子苷累积经皮释放时-量关系($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

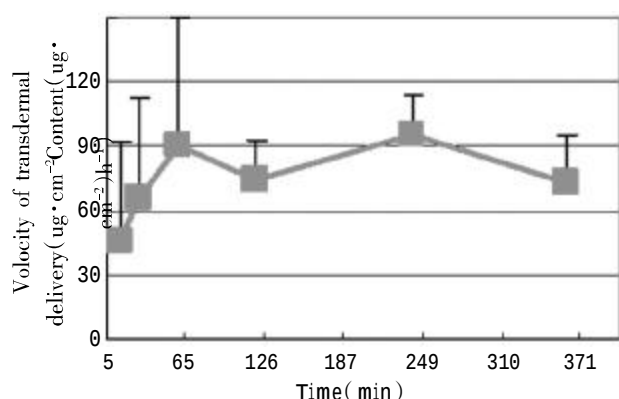


图3 体外实验伤益气雾剂中栀子苷经皮释放速率
($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{h}^{-1}$)($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

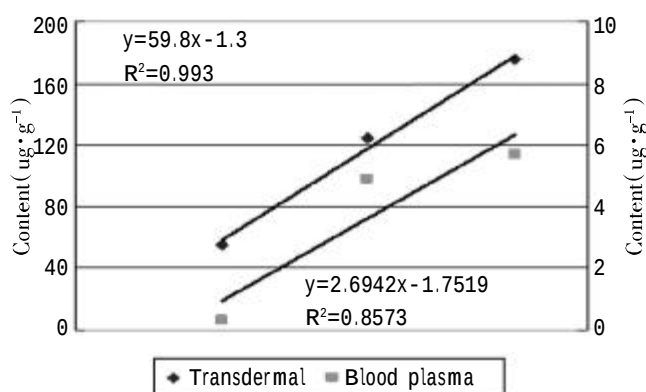


图4 不同给药次数给予伤益气雾剂中栀子苷在体经皮释放及血药浓度与给药次数的相关性($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

注: 经皮释放线性方程为: $y=59.8x-1.3$ ($R^2=0.993$);
血药浓度线性方程: $y=2.6942x-1.7519$ ($R^2=0.8573$)。

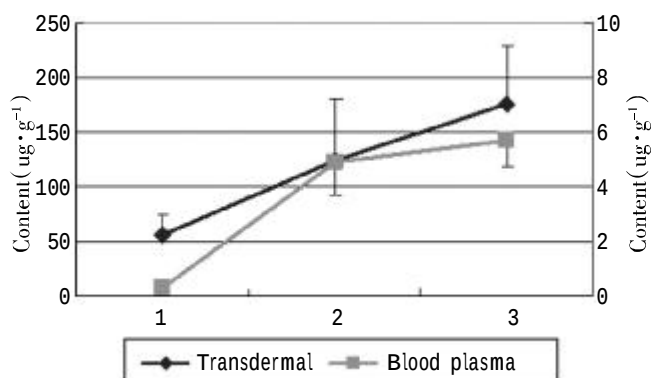


图5 不同给药次数给予伤益气雾剂中栀子苷在体经皮释放及血药浓度变化($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

注: 图中1, 2, 3分别表示给药次数, 各给药时间间隔为0.5h。

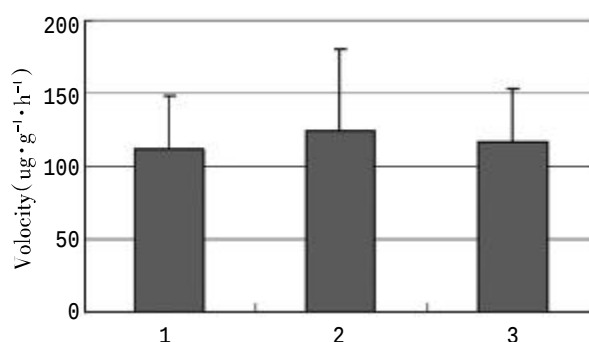


图6 伤益气雾剂不同给药次数栀子苷经皮释放速率
($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

注: 各组间释放速率无明显差异, $P>0.05$ 。

外周血中栀子苷浓度的测定仅从一个侧面佐证了皮下组织栀子苷测试结果的特异性, 栀子苷血药浓度与皮下透过含量呈明显的相关性(图4~5)。

伤益气雾剂中栀子苷可以透过皮肤并渗入皮下组织, 其在血中浓度的分布支持该药的透皮性。并为该药的外用功效提供了实验依据。由于伤益气雾剂是中药复方, 要对全方透皮效率及特点的特征尚有待于进一步的研究。

参考文献

- 1 梁晓东. 栀子止痛配伍的古今研究. 中国医药指南, 2008, 6(24): 375~377.
- 2 吴虹, 魏伟, 宋礼华. 栀子总苷的抗炎镇痛作用研究. 中国中医药信息杂志, 2006, 13(7): 31~33.
- 3 吴剑, 鲍同柱, 肖长义, 等. 栀子对兔膝关节炎模型关节软骨病理改变及 IL-1 β 表达的影响. 第二军医大学学报, 2009, 30(3): 329~331.
- 4 齐尚锋. 栀子跌打膏治疗急性踝关节扭伤临床观察. 中医正骨, 2009, 21(7): 44~46.
- 5 方尚玲, 刘源才, 张庆华, 等. 栀子苷镇痛和抗炎作用的研究. 时珍国医国药, 2008, 19(6): 1374~1376.
- 6 Li GH, Badkar A, Nema S, et al. In vitro transdermal delivery of therapeutic antibodies using maltose microneedles. International Journal of Pharmaceutics International Journal of Pharmaceutics, 2009, 368: 109~115.
- 7 Sonavane G, Tomoda K, Sano A, et al. In vitro permeation of gold nanoparticles through rat skin and rat intestine: Effect of particle size. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2008, 65: 1~10.
- 8 Morris AP, Brain KR, Heard CM. Skin permeation and ex vivo skin metabolism of O-acetyl haloperidol ester prodrugs. International Journal of Pharmaceutics, 2009, 367: 44~50.
- 9 王晓辉, 李丽, 申去非, 等. 不同剂型扑热息痛离体透皮吸收效果研究. 中国药房, 2008, 19(28): 2189~2191.
- 10 高春华, 郭伟英, 张亚秋, 等. 丁香油和高良姜油对阿魏酸透皮吸收的促进作用. 中国新药杂志, 2009, 18(9): 844~846.

- 11 Ran XR, Liang QL, Luo GA, et al. Simultaneous determination of geniposide, baicalin, cholic acid and hyodeoxycholic acid in rat serum for the pharmacokinetic investigations by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 2006, 842:22~27.
- 12 张倩怡, 杜守颖, 陆洋, 等. 栀子提取物中栀子苷油水分分配系数及大鼠肠吸收动力学研究. *中国中药杂志*, 2009, 34(14):1840~1844.
- 13 Hou YC, Tsai SY, Lai PY, et al. Metabolism and pharmacokinetics of genipin and geniposide in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 2008, 46:2764~2769.
- 14 魏凤玲, 吴青, 崔刚. 栀子苷乳剂透皮吸收研究. *医药导报*, 2008, 27(11):1380~1381.

Transdermal Behavior of Geniposide in Shangyi Aerosol in vivo and in vitro

Zhan Honglei¹, Wang Yugang¹, Zhu Zhaoyun², Hua Lei¹, Zhao Yi²,
Xu Rongxue², Lei Fan¹, Du Lijun¹

(1. Laboratory of Pharmaceutical Science, School of Life Science, School of Medicine, Tsinghua University, Beijing 100084, China;

2. Institute of Materia Medica of Yunnan Province, Kunming 650111, China)

Abstract: The transdermal behavior of geniposide was observed by using Shangyi aerosol for mice, and of the geniposide pharmacokinetics of this aerosol was studied. The geniposide concentration was determined in vitro and in vivo by the HPLC assay. Geniposide penetrated the skin 30 min after the aerosol use, and was found distributed in the hypodermis and the blood. The penetration of geniposide showed a positive linear relation. The results showed that geniposide of Shangyi aerosol could penetrate the skin both in vivo and in vitro, and be quickly distributed in the subcutaneous tissue and blood, which shows the use potential of the aerosol in clinics.

Keywords: Geniposide, Transdermal

(责任编辑:李沙沙, 责任译审:张立巍)