

## 青藤碱、雷公藤甲素皮肤和血液在体微透析方法的建立

李周, 王利胜\*, 巴文强, 张艳, 王玘, 廖卫国, 范文涛

广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510006

**摘要:** 目的 建立青藤碱、雷公藤甲素皮肤和血液在体微透析方法。方法 以青藤碱和雷公藤甲素的回收率( $R$ )为指标, 采用增量法考察灌流液体积流量对 $R$ 的影响, 并综合考虑实际操作时需要注意的因素, 确定青藤碱和雷公藤甲素微透析的体积流量和取样间隔; 采用增量法和减量法考察灌流液质量浓度对探针体外 $R$ 以及传递率( $D$ )的影响, 确定探针 $R$ 和 $D$ 之间的比例关系; 用在体微透析减量法, 考察一定时间间隔内皮肤和血液探针的 $D$ , 并确定探针 $R$ 的稳定性。结果 增量法中, 青藤碱、雷公藤甲素的皮肤和血液探针体外 $R$ 在 $0.5\sim 2.5\ \mu\text{L}/\text{min}$ , 随着体积流量的增高而降低, 综合考虑实际实验时间和数据准确性, 最后确定体积流量为 $1\ \mu\text{L}/\text{min}$ , 采样时间间隔为 $0.5\ \text{h}$ ; 体积流量为 $1\ \mu\text{L}/\text{min}$ 、青藤碱质量浓度为 $10\sim 40\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 和雷公藤甲素质量浓度为 $3\sim 12\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 青藤碱、雷公藤甲素皮肤和血液探针体外 $R$ 和 $D$ 稳定且相等, 说明药物质量浓度对微透析探针 $R$ 影响小、在体微透析可以用探针 $D$ 代替 $R$ ; 在体微透析减量法在 $10\ \text{h}$ 内测得的青藤碱和雷公藤甲素皮肤探针体内 $D$ 分别为 $(41.27\pm 0.87)\%$ 和 $(37.8\pm 0.99)\%$ , 血液微透析探针体内 $D$ 分别为 $(44.68\pm 1.28)\%$ 和 $(51.35\pm 1.15)\%$ , 说明青藤碱和雷公藤甲素在 $10\ \text{h}$ 内探针的 $D$ 保持稳定。结论 建立的青藤碱和雷公藤甲素皮肤与血液微透析方法可用于青藤碱和雷公藤甲素皮肤给药后皮肤和血液药动力学研究。

**关键词:** 皮肤微透析; 血液微透析; 青藤碱; 雷公藤甲素; 体外回收率

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)14-2076-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.14.010

## Establishment of skin and blood microdialysis sampling method of sinomenine and triptolide *in vivo*

LI Zhou, WANG Li-sheng, BA Wen-qiang, ZHANG Yan, WANG Ding, LIAO Wei-guo, FAN Wen-tao

School of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China

**Abstract: Objective** To establish skin and blood microdialysis (MD) method of sinomenine and triptolide. **Methods** Incremental method was applied and the recovery rate of sinomenine and triptolide was used as an index to investigate the impact of perfusion fluid flow rate to the recovery ( $R$ ). The flow rate and sampling interval were then determined according to the  $R$  and actual operation; The reduction method and incremental method were applied in the *in vitro* study to investigate impact of perfusate concentration to the  $R$  and a transfer rate ( $D$ ) and the proportional relationship between them; Reduction method was applied in the *in vivo* study to investigate and determine the stability of the probe recoveries. **Results** The recovery of skin and blood probes *in vitro* of sinomenine and triptolide increased with the flow rate in the range of  $0.5\sim 2.5\ \mu\text{L}/\text{min}$ . The flow rate was determined to be  $1\ \mu\text{L}/\text{min}$  and the sampling interval was determined to be  $0.5\ \text{h}$ ; The  $R$  of sinomenine and triptolide in skin and blood probes *in vitro* and  $D$  was stable and equal despite of change of sinomenine concentration in  $10\sim 40\ \mu\text{g}/\text{mL}$  and triptolide concentration in  $3\sim 12\ \mu\text{g}/\text{mL}$ , indicating that the effect of drug concentration on the MD probe  $R$  was small and that  $R$  could be replaced by the  $D$ ; The  $D$  *in vivo* using MD method was measured at  $10\ \text{h}$ . The  $D$  values of sinomenine skin and blood probe were  $(41.27\pm 0.87)\%$  and  $(37.8\pm 0.99)\%$ , respectively and those of triptolide were  $(44.68\pm 1.28)\%$  and  $(51.35\pm 1.15)\%$ , respectively, indicating that the  $D$  of sinomenine and triptolide was stable within  $10\ \text{h}$ . **Conclusion** The established method of sinomenine and triptolide in MD can be applied to investigate the kinetics in skin and blood after sc administration of formulation.

**Key words:** skin microdialysis; blood microdialysis; sinomenine; triptolide; recovery *in vitro*

收稿日期: 2015-03-09

基金项目: 广东省教育部产学研结合项目(2012B091100486); 中央财政支持地方高校发展专项资金[276(2014)]

作者简介: 李周(1990—), 男, 硕士在读, 研究方向为药物制剂新技术与新剂型。Tel: 15918737815 E-mail: zhongyao2lizhou@sina.com

\*通信作者 王利胜, 教授, 博士生导师, 主要从事药物制剂新剂型与新技术研究。Tel: (020)39358043 E-mail: wlis68@126.com

双藤微乳凝胶是本实验室开发的一种治疗类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)的局部外用制剂,由雷公藤 *Triperygium wilfordii* Hook. f. 和青风藤 *Sinomenii Caulis* 提取物制备而成,制成的微乳凝胶含青藤碱的量为 1.5%,含雷公藤甲素的量为 0.006 75%。

微透析技术(microdialysis, MD)是将灌流液采样技术和透析技术结合起来,从生物活体内进行动态微量生化采样的一种新技术<sup>[1]</sup>。利用微透析技术可以在基本上不干扰正常体内生命过程的情况下,实现活体的连续、动态采样,进而进一步进行定量分析,从而可以达到动态监测体内局部或者血液浓度的目的,具有微创、样品处理简单、所需实验动物少等优点,在药物动力学研究领域具有显著的优势<sup>[2-3]</sup>。

本课题组欲采用微透析技术研究考察双藤微乳凝胶经皮给药后的皮肤和血液药动学,但是微透析在采样的过程中,灌流体积流量、灌流液中药物的质量浓度以及微透析采样持续的时间都可能对微透析探针回收率( $R$ )造成影响<sup>[4]</sup>,因此在真正进行微透析实验前需要考察灌流液体积流量,药物质量浓度以及在体微透析持续的时间对探针  $R$  的影响,明确微透析方法的可行性;优化体外微透析方法的条件;并确立在体微透析  $R$  的测定方法,为在体微透析实验做准备。

## 1 仪器与材料

对照品青藤碱(批号 0774-200206,质量分数 $\geq 99\%$ )、雷公藤甲素(批号 140424,质量分数 $\geq 98\%$ ),中国食品药品检定研究院;无水乙醇,天津市致远化学试剂有限公司;甲醇,迪马公司,色谱纯;纯净水,华润怡宝饮料有限公司。

SD 大鼠,雄性,体质量( $200\pm 20$ ) g,由广州中医药大学实验动物中心提供,动物许可证号:SCXK(粤)2013-0020。

Waters 高效液相色谱仪,2487 紫外检测器,515 泵,美国 Waters 公司;N3000 色谱工作站,浙江大学;AUW120D 电子分析天平、ELB200 电子天平,日本岛津;微透析设备与系统,美国 BAS 公司,包括 MD1001 灌注器推进泵、MD0100 灌注器、MD1002 灌注器支架、MD1000 流速控制器;线性探针(CMA 30 MD,膜长 10 mm,截留相对分子质量 6 000)、血液探针(CMA 20 MD,膜长 10 mm,截留相对分子质量 2 000),瑞士 CMA 公司。

## 2 方法与结果

### 2.1 青藤碱和雷公藤甲素定量测定方法的建立

**2.1.1 色谱条件** 色谱柱为 Diamonsil C<sub>18</sub> 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu$ m);青藤碱和雷公藤甲素的流动相分别为甲醇-水(55:45,加入 0.2%三乙胺),甲醇-水(50:50);检测波长分别为 265、218 nm;体积流量为 1.0 mL/min;柱温为室温;进样量为 10  $\mu$ L。

**2.1.2 对照品储备液的制备** 精密称取青藤碱对照品 20.08 mg、雷公藤甲素对照品 6.01 mg,分别置于 10 mL 量瓶中,用甲醇定容至刻度,摇匀,得青藤碱质量浓度为 2.008 mg/mL 和雷公藤甲素质量浓度为 0.601 mg/mL 的对照品储备液。

**2.1.3 青藤碱微透析阴性样品与供试品溶液的制备** 体外微透析阴性样品:取 75  $\mu$ L 的雷公藤甲素对照品储备液,置于 5 mL 量瓶中,用乙醇-生理盐水(30:70)溶解至刻度,摇匀后取 1 mL 过 0.22  $\mu$ m 微孔滤膜,即得青藤碱体外微透析阴性样品。皮肤和血液在体微透析阴性样品:用乙醇-生理盐水(30:70)作为空白灌流液进行皮肤和血液微透析,所得透析液即为在体微透析阴性样品。体外和体内微透析液即为供试品溶液。

**2.1.4 雷公藤甲素微透析阴性样品与供试品溶液的制备** 体外微透析阴性样品:取 7.5  $\mu$ L 的青藤碱对照品储备液,置于 5 mL 量瓶中,用乙醇-生理盐水(30:70)溶解至刻度,摇匀之后取 1 mL 过 0.22  $\mu$ m 微孔滤膜,即得雷公藤甲素体外微透析阴性样品;雷公藤甲素皮肤和血液在体微透析阴性样品及供试品溶液的制备同青藤碱。

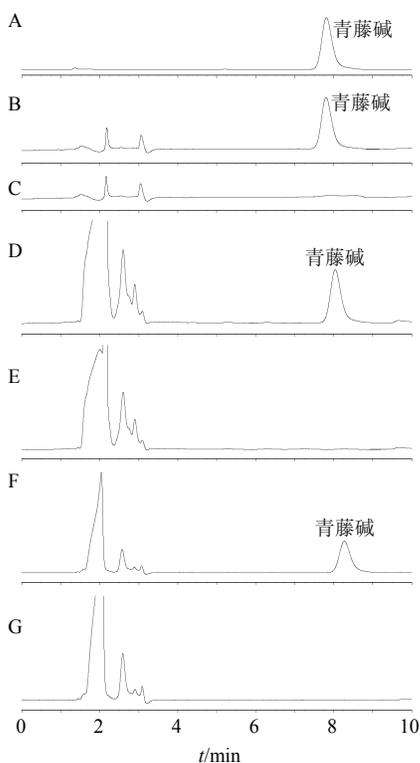
**2.1.5 标准曲线的绘制** 精密吸取青藤碱和雷公藤甲素对照品储备液,按照 12.5、2.0  $\mu$ L, 25.0、4.0  $\mu$ L, 50.0、6.0  $\mu$ L, 100.0、8.0  $\mu$ L, 200.0、10.0  $\mu$ L, 300.0、12.0  $\mu$ L 的体积分别加入 10 mL 量瓶中,用甲醇定容至刻度,即得质量浓度为 2.5、5.0、10.0、20.0、40.0、60.0  $\mu$ g/mL 的系列青藤碱对照品溶液和质量浓度为 1.2、2.4、3.6、4.8、6.0、7.2  $\mu$ g/mL 的雷公藤甲素系列对照品溶液,然后按照“2.1.1”项下色谱条件,依次进样,进样量 10  $\mu$ L,每个样品进样 3 次,分别对青藤碱和雷公藤甲素进行测定,以平均峰面积( $Y$ )对质量浓度( $X$ )进行线性回归,绘制标准曲线,得青藤碱回归方程  $Y=8\ 486.8 X+7\ 314.9$ ,  $r=0.999\ 7$ ,青藤碱在 2.5~60.0  $\mu$ g/mL 线性关系良好;得雷公藤甲素回归方程  $Y=34\ 384 X+$

15 210,  $r=0.999 6$ , 雷公藤甲素在  $1.2\sim 7.2 \mu\text{g/mL}$  线性关系良好。

**2.1.6 精密度试验** 取青藤碱质量浓度为  $20 \mu\text{g/mL}$ , 雷公藤甲素质量浓度为  $3.6 \mu\text{g/mL}$  的对照品溶液, 分别进样  $10 \mu\text{L}$ , 重复 6 次, 计算得青藤碱和雷公藤甲素峰面积积分值的 RSD 值分别为 1.34% 和 1.09%, 表明仪器的精密度良好。

**2.1.7 稳定性试验** 取透析液样品溶液  $10 \mu\text{L}$ , 分别于 1、2、4、8、12、24 h 进样, 计算得青藤碱和雷公藤甲素峰面积积分值的 RSD 值分别为 2.23% 和 2.21%, 表明供试品溶液在 24 内稳定。

**2.1.8 专属性试验** 取青藤碱、雷公藤甲素阴性样品、供试品以及对照品溶液, 按“2.1.1”项下色谱条件测定, 色谱图见图 1、2。透析液中其他物质, 以及青藤碱和雷公藤甲素之间对其各自的测定不会造成干扰。



A-对照品 B-体外微透析样品(皮肤、血液探针) C-体外微透析阴性样品(皮肤、血液探针) D-血液微透析样品 E-血液微透析阴性样品 F-皮肤微透析样品 G-皮肤微透析阴性样品, 图2同  
A-reference substance B-skin and blood microdialysate sample *in vitro* C-skin and blood blank microdialysate *in vitro* D-blood microdialysate *in vivo* E-blood blank microdialysate *in vivo* F-skin microdialysate *in vivo* G-skin blank microdialysate *in vivo*, same in figure 2

图1 青藤碱的 HPLC 图  
Fig. 1 HPLC of sinomenine

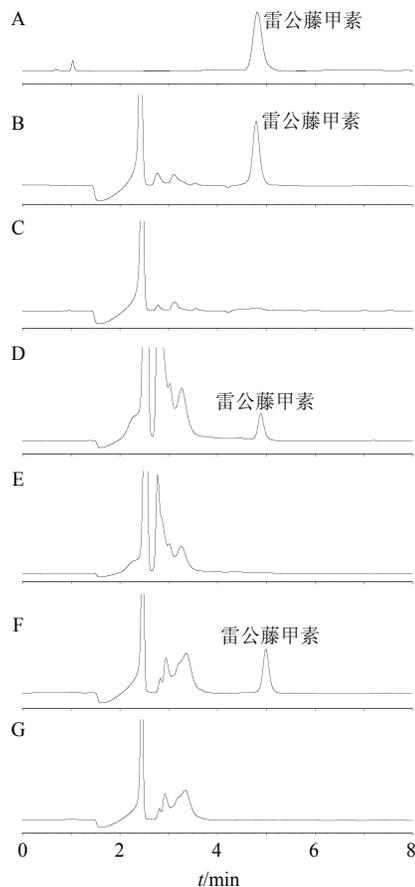


图2 雷公藤甲素的 HPLC 图  
Fig. 2 HPLC of triptolide

### 2.2 微透析 R 和传递率 (D) 的计算方法

在微透析过程中, 物质的透膜扩散具有双向性, 增量法中物质(药物)从膜外向膜内扩散的过程, 称为回收, 由此对应的 R 计算公式为  $R = C_{\text{dialysate}}/C_s$ ,  $C_{\text{dialysate}}$  为透析液的质量浓度,  $C_s$  为探针透析膜外的质量浓度(本实验即指烧杯中对照品的质量浓度)。

而在减量法中, 物质(药物)从膜内向膜外扩散的过程, 称为传递或释放, 由此对应的 D 计算公式为  $D = (C_{\text{perfusate}} - C_{\text{dialysate}})/C_{\text{perfusate}}$ ,  $C_{\text{perfusate}}$  为灌流液的质量浓度。

### 2.3 增量法优选体外微透析最佳体积流量

微透析方法在从组织液连续取样的过程中, 组织中的物质(包括药物)在探针透析膜内外的分布处于一种动态平衡, 灌流液的连续流动导致了药物在组织液和灌流液之间的扩散不能完全达到平衡, 因此体积流量对探针的 R 有一定的影响, 另外相同时间段内体积流量越大取样量越多, 因此在体微透析实验之前需要从 R 和取样量 2 个方面优选最佳灌流体积流量。

**2.3.1** 系列质量浓度的青藤碱和雷公藤甲素溶液的配制 取 100、75、50、25  $\mu\text{L}$  青藤碱对照品储备液置于 5 mL 量瓶中,同时按顺序加入 1.0、0.75、0.5、0.25 mL 雷公藤甲素对照品储备液,用 30%乙醇-生理盐水定容至刻度,得含青藤碱和雷公藤甲素质量浓度分别为 40、12  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 30、9  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 20、6  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 10、3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的混合溶液。

**2.3.2** 增量法体外微透析试验 将皮肤和血液探针的微透析膜部分分别浸于 2 个装有青藤碱和雷公藤甲素质量浓度为 30、9  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 30%乙醇-生理盐水混合溶液的烧杯中,烧杯置于恒温磁力搅拌器上,保持温度 37  $^{\circ}\text{C}$ ,转速 200 r/min,启动微灌注泵,将空白的灌流液(30%乙醇-生理盐水)以不同的体积流量(0.5、1.0、1.5、2.0、2.5  $\mu\text{L}/\text{min}$ )同时对血液和微透析探针进行灌注,各体积流量平衡 1 h 后收集样品,每管收集 60  $\mu\text{L}$ ,共收集 6 管样品,按“2.1.1”项下色谱条件分别测定青藤碱和雷公藤甲素的质量浓度,并按照“2.2”项下公式计算  $R$ ,结果见图 3。由图 3 可以看出青藤碱、雷公藤甲素皮肤和血液探针体外  $R$ ,随着灌流体积分流量的增加, $R$  都呈现降低的趋势,当体积流量为 0.5  $\mu\text{L}/\text{min}$  时, $R$  最高,但是选择最佳的灌流体积分流量还必须考虑合适的取样量,单纯提高  $R$  而使用过低的体积分流量,需要较长的采样时间,将丢失部分质量浓度变化的详细信息<sup>[5]</sup>,另外在体微透析实验时实验动物麻醉的时间也就越长,这样可能对实验动物和实验数据都会有一定的影响。本实验中,当体积分流量为 1.0  $\mu\text{L}/\text{min}$  时青藤碱皮肤和血液探针  $R$  分别为 (69.7  $\pm$

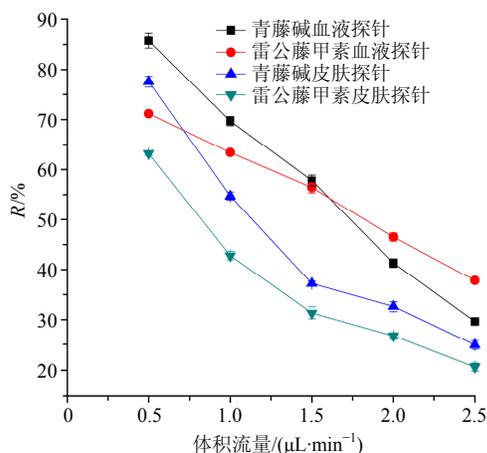


图 3 体积分流量对青藤碱、雷公藤甲素皮肤和血液探针体外  $R$  的影响 ( $n = 3$ )

Fig. 3 Influence of flow rate to *in vitro*  $R$  of sinomenine and triptolide for blood and skin MD probe ( $n = 3$ )

0.98) %、(54.7  $\pm$  0.76) %, 雷公藤甲素皮肤血液探针  $R$  分别为 (63.4  $\pm$  0.46) %、(42.8  $\pm$  0.85) %,已经基本能够满足微透析  $R$  的要求<sup>[6]</sup>。因此综合考虑,最后选择的体积分流量为 1.0  $\mu\text{L}/\text{min}$ ,取样时间间隔为 0.5 h。

## 2.4 质量浓度对青藤碱、雷公藤甲素皮肤和血液探针体外 $R$ 的影响

在体微透析试验时,动物给药后皮肤和血液中的药物质量浓度发生变化时,若探针  $R$  随药物质量浓度的变化而变化,则很难用  $R$  对透析液中药物质量浓度进行校正;另外在体微透析实验时,药物的  $R$  通常采用反透析法进行测定,即用在体微透析的  $D$  代替  $R$  对透析液的药物质量浓度进行校正,但反透析法的前提是探针的  $R$  和  $D$  相等<sup>[7]</sup>,因此需要考察体外  $R$  和  $D$  的关系。

**2.4.1** 增量法 将皮肤或血液微透析探针透析膜部分分别浸于含药溶液的烧杯中,烧杯置于恒温磁力搅拌器上,保持温度 37  $^{\circ}\text{C}$ ,转速 200 r/min,含药溶液分别为“2.3.1”项下 4 个青藤碱和雷公藤甲素质量浓度为 40、12  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 30、9  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 20、6  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 10、3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 30%乙醇-生理盐水混合溶液。启动微透析泵,将空白的灌流液(30%乙醇-生理盐水)以体积分流量 1.0  $\mu\text{L}/\text{min}$  同时对血液和微透析探针进行灌注,各体积分流量平衡 1 h 后收集样品每管收集 30  $\mu\text{L}$ ,共收集 6 管样品,按“2.1.1”项下色谱条件分别测定青藤碱和雷公藤甲素的质量浓度,并按照“2.2”项下公式计算  $R$ 。

**2.4.2** 减量法 将皮肤或血液探针透析膜部分分别浸于装有 30%乙醇-生理盐水的烧杯中,烧杯置于恒温磁力搅拌器上,保持温度 37  $^{\circ}\text{C}$ ,转速 200 r/min,启动微透析泵,依次用青藤碱和雷公藤甲素质量浓度为 40、12  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 30、9  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 20、6  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 10、3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 30%乙醇-生理盐水混合溶液同时对皮肤和血液探针进行灌流,体积分流量为 1.0  $\mu\text{L}/\text{min}$ ,各体积分流量平衡 1 h 后收集样品,每管收集 30  $\mu\text{L}$ ,共收集 6 管样品,按“2.1.1”项下色谱条件分别测定青藤碱和雷公藤甲素的质量浓度,并按照“2.2”项下公式计算  $D$ 。结果见图 4、5。

从图 4、5 可以看出青藤碱在质量浓度为 10~40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,增量法和减量法测得皮肤、血液探针的  $R$  和  $D$  保持稳定且几乎相等,测得的青藤碱皮肤探针体外  $R$  和  $D$  分别为 (56.30  $\pm$  0.54) %、(55.20  $\pm$  0.63) %,血液探针体外  $R$  和  $D$  分别为 (75.7  $\pm$

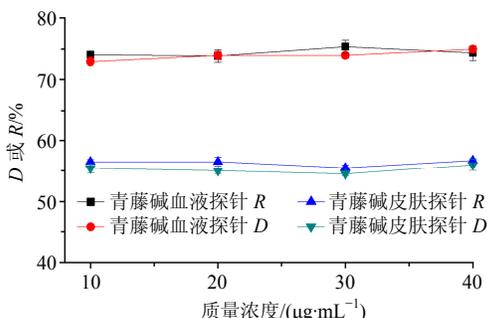


图 4 质量浓度对青藤碱皮肤、血液探针体外 R/D 的影响 (n = 3)

Fig. 4 Influence of concentration to *in vitro* R of sinomenine for blood and skin MD probe (n = 3)

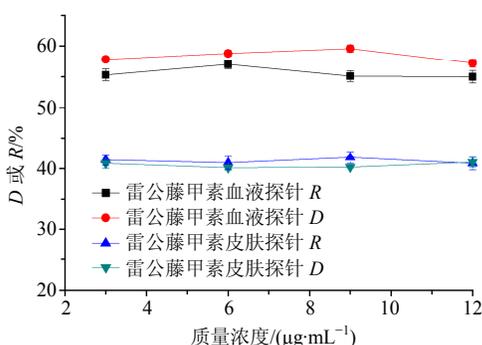


图 5 质量浓度对雷公藤甲素皮肤、血液体外探针 R/D 的影响 (n = 3)

Fig. 5 Influence of concentration to *in vitro* R of triptolide for blood and skin MD probe (n = 3)

2.55) %、(74.10±0.82) %; 雷公藤甲素在质量浓度为 3~20 μg/mL, 增量法和减量法测得的皮肤、血液探针的 R 和 D 保持稳定且基本相等, 测得的雷公藤甲素皮肤探针体外 R 和 D 分别为 (41.2±0.42) %、(40.53±0.44) %, 血液探针体外 R 和 D 分别为 (55.6±0.94) %、(58.38±1.06) %, 说明了质量浓度对青藤碱和雷公藤甲素皮肤、血液探针 R 影响较小, 且可以用探针的 D 来代替探针的 R。由此可知, 在体微透析实验时, 可以用反透析法测定药物的 R, 即用在体微透析探针 D 代替在体 R 对在体微透析数据进行校正。

### 2.5 在体微透析探针 D 的测定与稳定性考察

在体微透析实验时, 一段时间后皮肤特别是血液内的一些内源性的物质可能会堵塞探针透析膜, 致使探针 R 下降, 在这种情况下某个时间点测得探针 R 就不能再代替整个微透析采样过程的 R, 增加实验的难度, 所以首先应该考察探针在体微透析时 D 的稳定性。

#### 2.5.1 在体皮肤探针与血液探针的植入 皮肤探针

的植入: 取雄性 SD 大鼠, ip 20%乌拉坦(6.0 mL/kg)麻醉, 仰卧位固定于加热垫上, 用记号笔在腹部皮肤标记探针的植入点和出口位置(入口和出口位置相隔 2 cm), 将引导针针头从入口端穿过皮肤, 出口端引出, 线性微透析探针从针头处小心引入, 移动微透析探针当半透膜装置于给药部位皮肤下后将引导针慢慢抽出, 此时探针膜则留在需要采样的部位, 用组织胶将探针入口和出口位置固定放置大鼠摇摆损坏探针, 整个操作过程用空白灌流液灌流, 以保持探针处于湿润状态。

血液探针的植入: 取雄性 SD 大鼠, ip 肝素钠注射液 500 U/kg 来产生持久的抗凝血功效, ip 20%乌拉坦(6.0 mL/kg)麻醉, 右侧肩胛骨上侧去毛, 75%酒精消毒, 开 3 cm 左右的切口, 钝性剥离筋膜、脂肪等, 分离出颈静脉, 在分岔口出结扎颈静脉。离颈静脉分叉处尽心段 5 mm 用眼科角膜剪剪一 V 型小口, 小心将探针朝右心室方向植入约 2.5 cm, 并用缝口线将探针固定于周围组织, 缝合皮肤。整个操作作用空白灌流液灌流, 以保持探针膜处于润湿状态。

2.5.2 在体微透析试验 在皮肤探针和血液探针植入之后, 用微透析泵吸取青藤碱和雷公藤甲素质量浓度为 30、9 μg/mL 混合溶液 1 mL, 启动微透析泵同时进行灌流, 体积流量为 1.0 μL/min, 平衡 1 h 后开始收集透析液, 每 30 分钟收集 1 次, 连续收集 10 h, 按照“2.1.1”项下色谱条件分别测定透析液中青藤碱和雷公藤甲素的质量浓度, 并按照“2.2”项下公式计算青藤碱和雷公藤甲素在体微透析探针 D。结果见图 6。由图 6 可知, 青藤碱、雷公藤甲素皮肤和血液探针 D 在 10 h 内保持稳定, 经计算测得的青藤碱和雷公藤甲素皮肤探针体内 D 分别为 (41.27±0.87) %、(37.8±0.99) %, 血液微透析探

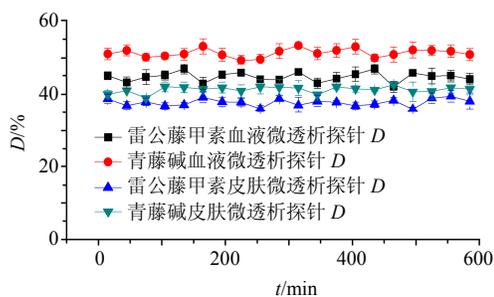


图 6 青藤碱、雷公藤甲素皮肤和血液在体微透析探针 D 稳定性 (n = 3)

Fig. 6 Stability of D of sinomenine and triptolide for blood and skin MD probe *in vivo* (n = 3)

针体内  $D$  分别为  $(44.68 \pm 1.28)\%$ 、 $(51.35 \pm 1.15)\%$ ，说明在体微透时，可用某个时间点的析探针  $D$  作为整个微透析过程的探针  $D$ ，进而对所测药动数据进行校正，另外这也说明了建立的青藤碱、雷公藤甲素体外微透析方法可以用于皮肤和血液在体微透析研究，微透析技术用于双藤微乳凝胶皮肤给药后青藤碱、雷公藤甲素在皮肤和血液的药动学研究是可行的。

### 3 讨论

本实验首次建立了青藤碱、雷公藤甲素 2 种成分皮肤及血液微透析的方法，通过体外实验确定了微透析的最佳灌流体积流量并且发现药物质量浓度不会对探针  $R$  造成影响，明确了微透析方法的可行性，另外通过探针体外  $R$  和  $D$  以及探针在体  $D$  的稳定性考察，确定了反透析法可以用于在体微透析实验时  $R$  的测定，最后确立了青藤碱、雷公藤甲素皮肤和血液在体微透析方法。

在本实验“2.5”项下内容中，若实验结果表明探针的  $D$  随着时间的延长而降低，这种情况下可以考虑用内标法测定在体微透析时药物的  $R$ ，内标法是在实验时往灌流液中加入另外一种合适的物质作为内标物，通过计算每一个取样点的内标物的  $R$  换算出待测药物的  $R$ ，从而计算出组织周围的药物质量浓度。内标法可以在每个取样点校正一次探针的  $R$ ，从而消除实验过程中  $R$  波动的影响<sup>[8]</sup>。而本实验结果表明探针 10 h 内在体  $D$  是稳定的，因此只需在在体微透析给药前测定探针的  $D$  即可作为 10 h 内探针的  $D$ ，进而根据反透析法计算探针的  $R$ ，可降低实验的难度。

为了尽量减少微透析对实验动物内环境的影响，提高实验数据的准确性，在体微透析时，空白灌流液一般用和动物血液或组织液相似的林格氏液，本实验所用的空白灌流液为 30%乙醇-生理盐水，是因为雷公藤甲素在林格氏液中的溶解度很小，为了提高雷公藤甲素在灌流液中的溶解度，进而提高雷公藤甲素的  $R$ ，本实验根据文献报道选择了 30%乙醇-生理盐水作为空白灌流液<sup>[9]</sup>。

本实验用增量法和减量法考察质量浓度对体外微透析探针  $R$  和  $D$  的影响时，发现随着质量浓度的变化， $R$  和  $D$  保持稳定并且相等，由此可知在体微透析时可以用  $D$  代替  $R$ 。在进行在体微透析实验时， $R$  是没有办法测定的，只能测定  $D$ ，可以根据公式用体外  $R$  和  $D$  的比值进而计算体内  $R$ <sup>[10-11]</sup>，因此弄

清楚体外  $R$  和  $D$  之间的关系很重要。在一定的体积流量下，当体外  $R$  和  $D$  不随质量浓度的变化即可算出  $D$  和  $R$  的比例，进而在知道某时刻体内  $D$  的情况下，即可算出该时刻的体内  $R$ ，所以体外  $R$  和  $D$  在同一质量浓度不相等的情况下依然可以计算体内  $R$ 。本实验在体微透析部分中，每个微透析样品是一个时间段取得的，所以微透析样品的质量浓度应该是这个时间段的平均质量浓度，在以  $D$  为纵坐标，时间为横坐标作图时，以及后续的药动学研究所做的药时曲线都只能选择时间段的中间时刻作为横坐标，而不能以时间段的终点作为横坐标。

### 参考文献

- [1] 张亚军, 杨建宏, 韩娇娇, 等. 在体皮肤微透析技术评价苦参碱传递体的透皮释药性能 [J]. 中草药, 2013, 44(23): 3341-3345.
- [2] 刘霞, 郭秀彩, 徐红月, 等. 芥子碱皮肤和血液微在体透析方法的建立 [J]. 中成药, 2012, 34(6): 1039-1044.
- [3] 朱黎霞, 张英丰. 基于微透析技术结合液质联用的丹酚酸 B 正常和高脂血症大鼠药动学比较研究 [J]. 中草药, 2015, 46(1): 90-95.
- [4] 鄢欢, 曹玲娟, 李焕德, 等. 提高微透析探针回收率方法的研究进展 [J]. 中南药学, 2014, 12(2): 140-143.
- [5] 吕耿彬, 王利胜, 陈晓丹, 等. 人参皂苷  $Rg_1$ 、三七皂苷  $R_1$  微透析体外回收率的研究 [J]. 广州中医药大学学报, 2013, 30(1): 59-62.
- [6] 徐月红, 叶卉, 郭秀彩, 等. 微透析联用反相高效液相色谱研究白芥子涂方皮肤药动学 [J]. 中草药, 2012, 43(2): 336-339.
- [7] 王丹, 石立夫, 胡晋红, 等. 微透析技术探针回收率的影响研究进展 [J]. 国际药学研究杂志, 2008, 35(4): 261-265.
- [8] 凌家俊, 陈翔. 内标法测定烟碱微透析回收率的可行性研究 [J]. 药学学报, 2010, 45(5): 632-635.
- [9] 邓亚利, 周莉玲. 微透析联用高效液相色谱法研究青藤碱雷公藤甲素巴布剂的裸鼠在体透皮吸收过程 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(17): 118-121.
- [10] Zhou W H, He S Y, Yang Y J, et al. Formulation, characterization and clinical evaluation of propranolol hydrochloride gel for transdermal treatment of superficial infantile hemangioma [J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2014, doi: 10.3109/03639045.2014.931968.
- [11] Zheng H, Shi L F, Hu J H. Pharmacokinetic study of free-from sinomenine in rat skin microdialysis coupled with liquid chromatography-electrospray mass spectrometry [J]. *Biomed Chromatogr*, 2007, 21(1): 101-106.