

20(S)-原人参二醇4种剂型在体透皮实验的初步研究

陈婧^{1,2}, 韩美华¹, 王健³, 季宇彬², 王向涛^{1*}

(1. 中国医学科学院药用植物研究所, 北京 100193; 2. 国家教育部抗肿瘤天然药物工程研究中心, 哈尔滨商业大学
生命科学与环境科学研究中心药物研究所 博士后科研工作站, 黑龙江 哈尔滨 150076;

3. 黑龙江中医药大学, 黑龙江 哈尔滨 150040)

摘要:目的 研究20(S)-原人参二醇(PPD)4种剂型的制备及大鼠在体PPD透皮吸收情况。方法 用薄膜超声法制备PPD药质体和醇质体,用超声法制备环糊精包合物,用增溶法制备PPD溶液;建立在体透皮试验中PPD的HPLC测定方法;利用皮肤剩余量法计算PPD4种剂型透皮18h后残留在皮肤内的药量。色谱条件: COSMO-SIL 5 C₁₈-MS-II 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为甲醇-水(90:10);体积流量1.0 mL/min;检测波长203 nm;柱温25℃;进样量50 μL。结果 豆磷脂、羟丙基-β-环糊精(HP-β-CD)空白皮肤洗液和试剂对药物的测定无干扰,PPD质量浓度在0.1~0.5 mg/mL与峰面积的线性关系良好($r=0.9999$),回收率均在96.93%~104.78%,日内及日间RSD均小于1.54% ($n=3$)。PPD药质体、PPD醇质体、PPD β-环糊精包合物、PPD原药液的皮肤剩余量分别为69.6%、86.36%、100%、73.55%。结论 RP-HPLC法能很好地测定PPD的量,且回归方程线性均较好,表明建立的在体透皮试验方法准确、稳定,适用于PPD经皮给药系统制剂的在体透皮试验研究。

关键词 20(S)-原人参二醇;在体透皮实验;皮肤剩余量法;反相高效液相色谱法

中图分类号: R943

文献标识码: A

文章编号: 1674-5515(2009)06-0354-05

The preliminary study on *in vivo* transdermal experiments of 20(S)-protopanaxadiol (PPD) of four formulations

CHEN Jing^{1,2}, HAN Mei-hua¹, WANG Jian³, JI Yu-bin², WANG Xiang-tao¹

(1. Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College Institute of Medicinal Plant Development, Beijing 100193, China; 2. Engineering Research Center of Natural Anticancer Drugs; Ministry of Education, Postdoctoral Research Station, Institute of Materia Medica, Life Sciences and Environmental Sciences Research Center, Harbin Commerce University, Harbin 150076, China; 3. Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

Abstract: Objective To study the preparation of 20(S)-protopanaxadiol (PPD) in four formulations and the *in vivo* percutaneous absorption in rats. **Methods** PPD pharmacosomes and PPD plastid alcohol were prepared by means of film ultrasound, β-cyclodextrin inclusion were prepared by using ultrasound, and original liquid by solubilization. The RP-HPLC method was studied for determining PPD *in vivo* transdermal test. The remaining skin method was adopted to calculate the remaining volume of the four formulations after 18 h. The HPLC separation was performed with a COSMOSIL 5 C₁₈-MS-II column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), with methanol-water (90:10) as the mobile phase and the detection wavelength at 203 nm. The column temperature was 25℃. The flow rate was 1.0 mL/min, and 50 μL sample solution was injected. **Results** Under the above-mentioned chromatographic conditions, soybean phospholipid, HP-β-CD, blank skin lotion and reagents did not interfere the determination of the drug. The calibration curve was linear within the range 0.1~0.5 mg/mL ($r=0.9999$), and the average recovery was between 96.93%~104.78%. Both the intra-day and inter-day RSD were less than 1.54% ($n=3$). The remaining volumes of PPD pharmacosomes, PPD plastid alcohol, PPD β-cyclodextrin inclusion and PPD orig-

* 通讯作者 王向涛(1973—),男,副研究员,主要从事微粒给药系统的研究。Tel:010-62898798, E-mail:xtaowang@163.com

inal liquid were respectively 69.6%, 86.36%, 100%, and 73.55%. **Conclusion** The RP-HPLC method can be well applied to the determination of PPD. The *in vivo* transdermal test method is accurate, stable, and applicable for the study of *in vivo* transdermal experiments of PPD.

Key words: 20(S)-protopanaxadiol (PPD); *in vivo* transdermal experiments; remaining skin method; reversed-phase high performance liquid chromatography

20(S)-原人参二醇 (protopanaxdiol, PPD) 是利用西洋参 *Panax quinquefolium* L. 茎叶中提取、分离、转化而得到的人参皂苷元^[1]。国外学者报道了 PPD 具有较强的抑制肿瘤细胞生长的作用^[2-4]。但 PPD 的水溶性低 (不到 30 $\mu\text{g/mL}$), 导致其口服生物利用度较低, 在一定程度上限制了其临床疗效的发挥。笔者试图利用改变 PPD 给药途径的方法来改善其临床疗效。

经皮给药系统 (transdermal drug delivery system, TDDS) 是通过皮肤给药后经渗透到达体内血液, 并长时间稳定有效血药浓度的缓控释系统。药物经皮给药系统可避免肝脏的首过效应及胃肠道的降解, 维持稳定、持久的血药浓度。笔者制备了 PPD 药质体、醇质体、环糊精包合物、原药液 4 种剂型, 并用大鼠皮肤剩余量法对其经皮透过性进行考察, 尝试筛选出一种合适的经皮给药制剂。关于 PPD 制剂透皮实验的设想和研究, 目前国内外未见相关文献报道。

1 实验材料

1.1 药品与试剂

20(S)-原人参二醇 (上海中药创新研究中心提供, 质量分数 > 99%), 豆磷脂 (郑州四维磷脂技术有限公司), 羟丙基- β -环糊精 (Cavasol[®], HP- β -CD) (广州市泰龙生化科技有限公司, wacker chemie 产品), 水为高纯水, 甲醇为色谱纯, 其他试剂及辅料均符合药用级标准或分析纯。

1.2 动物

雄性 SD 大鼠, 体质量 (300 $\pm$ 5) g [中国医学科学院实验动物研究所提供, 合格证号: SCXF (京) 2006-2009]。

1.3 仪器

KQ3200DB 型数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); RE-52CS 旋转蒸发仪 (上海振捷实验设备有限公司); SHB-III 循环水式多用真空泵 (郑州长城科工贸有限公司); W220 数控升降浴锅 (上海振捷实验设备有限公司); Ultimate 3000 Series 高效液相色谱仪 (Dionex); COSMOSIL 5 C₁₈-

MS-II 色谱柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm) (Waters, Nacalai Tesque Inc. Kyoto, Japan); AT-950 Heater and cooler 柱温箱 (天津奥特赛恩斯仪器有限公司)。

2 方法与结果

2.1 PPD 4 种剂型的制备

2.1.1 PPD 药质体的制备

精密称取豆磷脂和 PPD (豆磷脂: PPD 物质的量比 5:3), 置茄形瓶中, 以适量氯仿溶解。25 $^{\circ}\text{C}$ 减压旋转蒸发除去有机溶剂, 使在瓶壁上形成均匀干燥的薄膜; 加入一定体积的水相, 使药质体中 PPD 的质量浓度为 3 mg/mL, 常温水化 30 min, 60 $^{\circ}\text{C}$ 超声 30 min, 即得。

2.1.2 PPD 醇质体的制备

精密称取豆磷脂和 PPD (豆磷脂: PPD 物质的量比 5:3), 置茄形瓶中, 以适量氯仿溶解。25 $^{\circ}\text{C}$ 减压旋转蒸发除去有机溶剂, 使在瓶壁上形成均匀干燥的薄膜; 加入一定体积的 30% 乙醇溶液, 使醇质体中 PPD 的质量浓度为 3 mg/mL, 常温水化 30 min, 60 $^{\circ}\text{C}$ 超声 30 min, 即得。

2.1.3 PPD HP- β -CD 包合物的制备

取 HP- β -CD 适量溶于去离子水, 适当加热制备成 0.5 g/mL 的溶液, 按照 PPD 质量浓度 6 mg/mL 取所需量 PPD, 适当超声均匀分散在环糊精的水溶液中, 60 $^{\circ}\text{C}$ 加热、振摇, 并辅以短时间超声, 至溶液完全澄清, 冷却至室温, 即得。

2.1.4 PPD 原药液的制备

称取 PPD 适量溶于 DMSO 中, 加入聚山梨酯 80 和生理盐水, 按照 DMSO、聚山梨酯 80 和生理盐水的体积比为 0.5:0.5:9 配制成溶液, PPD 质量浓度为 2.5 mg/mL。

2.2 PPD 在体透皮实验

将大鼠随机分为 4 组, 每组 5 只, 采用 PPD 药质体、PPD 醇质体、PPD HP- β -CD 包合物和 PPD 原药液 4 种制剂分别进行实验。实验前给大鼠 ip 10% 乌拉坦进行麻醉 (每 100 g 体质量注射 1 mL)。用电动剃毛剪剃净背部鼠毛, 用水洗净擦干, 并检查皮肤完整性。将底面积为 3.46 cm² 的圆筒紧贴在

每只大鼠背部画1个圆,分别将PPD药质体、醇质体、环糊精溶液及PPD原药液涂于4组大鼠的背部,每只大鼠每处涂药200 μL 。给药后18 h取下给药区域的皮肤,分别以水、50%乙醇、无水乙醇洗下残留在皮肤表面的药物。皮肤洗涤液减压回收溶剂,残液冻干,残渣用甲醇溶解,定容。取上清液过0.22 μm 滤膜,进样50 μL ,以HPLC测定其中PPD的剩余量。另取PPD药质体、醇质体、PPD β -环糊精包合物及PPD原药液各200 μL ,冻干后用甲醇溶解、定容,同法以HPLC测PPD的量,作为对应剂型中的总药量。采用皮肤剩余量法计算。

2.3 PPD测定方法

2.3.1 色谱条件

COSMOSIL 5 C₁₈-MS-II 色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-水(90:10);柱温:25 $^{\circ}\text{C}$;体积流量:1.0 mL/min;检测波长:203 nm^[7];进样量:50 μL 。笔者参照文献已经对豆磷脂和PPD对照品进行分离^[8]。在此色谱条件下取空白大鼠皮肤洗液及PPD样品溶液,进样分析,得HPLC图谱如图1所示。由图可见,空白大鼠皮肤洗液对药物测定无干扰,PPD峰的保留时间约为24.5 min。

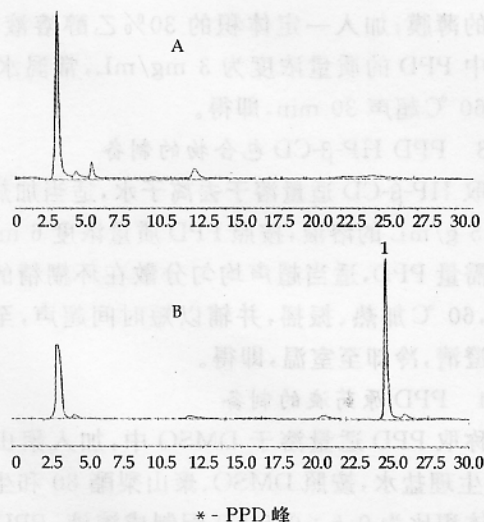


图1 空白大鼠皮肤洗液(A)、PPD样品溶液(B)的HPLC图

2.3.2 对照品溶液的制备

精密称取PPD对照品20.0 mg,置于10 mL量瓶中,用甲醇溶解,并定容至刻度,摇匀,得PPD对照品储备液。

2.3.3 供试品溶液的制备

取“2.1”项下制备的PPD 4种剂型,按“2.2”项

下方法进行在体透皮实验,皮肤洗液减压回收溶剂,残液冻干,用甲醇溶解,定容。取上清液过0.22 μm 滤膜,即得供试品溶液。

2.3.4 阴性对照溶液的制备

取按“2.1”项下方法制备的、不含PPD药物的4种空白剂型,按“2.3.3”项下方法操作,得阴性对照溶液。

2.3.5 标准曲线的建立

精密吸取PPD对照品储备液0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mL分别置于10 mL量瓶中,甲醇定容,得质量浓度分别为0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mg/mL的PPD溶液,吸取该溶液50 μL ,在“2.3.1”项色谱条件下测定3次,以峰面积积分值为纵坐标(A)、浓度为横坐标(C)进行线性回归,得回归方程 $A = 354.93C - 0.3947$ ($r = 0.9999$),线性范围为0.1~0.5 mg/mL,表明线性关系良好。

2.3.6 精密度试验

精密吸取供试品溶液50 μL ,连续进样6次,测定峰面积,RSD为0.09%,表明本实验精密度良好。

2.3.7 稳定性试验

取同一种供试品溶液,分别于0、2、4、6、8、10 h测定,RSD为1.18%,表明样品供试液在10 h内基本稳定。

2.3.8 回收率试验

取阴性对照溶液配制0.15、0.3、0.45 mg/mL低、中、高3种质量浓度的PPD溶液,每种浓度溶液配制3份样品。进样50 μL ,在“2.3.1”项色谱条件下测定峰面积,计算回收率。结果见表1。

表1 回收率试验结果($n=3$)

PPD剂型	PPD/(mg $\cdot$ mL ⁻¹)	平均回收率/%	RSD/%
药质体	0.15	103.11	0.77
	0.30	104.22	0.39
	0.45	104.78	0.51
醇质体	0.15	101.78	1.54
	0.30	103.78	1.22
	0.45	96.93	1.50
HP- β -CD包合物	0.15	98.67	1.34
	0.30	99.33	1.34
	0.45	104.42	0.20
原药液	0.15	97.82	1.33
	0.30	98.44	1.39
	0.45	103.44	1.17

2.4 PPD 4种制剂在体透皮实验结果

采用皮肤剩余量法计算在体透皮实验中PPD在大鼠皮肤表面的剩余量,并推导进入皮肤的药量。

结果见表 2。

表 2 PPD 4 种制剂在体透皮实验结果

PPD 剂型	皮肤表面剩余量/%	进入皮肤量/%
药质体	69.60	30.40
醇质体	86.36	13.64
HP- β -CD 包合物	100.00	0.00
原药液	73.55	26.45

结果表明,建立的在体透皮试验方法准确,适用于 PPD 经皮给药系统制剂的在体透皮试验研究。

通过皮肤剩余量法计算,PPD 透过皮肤量的多少依次为:药质体>原药液>醇质体>HP- β -CD 包合物。结果表明 PPD HP- β -CD 包合物完全没有透过,PPD 药质体、PPD 醇质体和 PPD 原药液均有不同程度的透皮效果,其中 PPD 药质体透过率达 30.4%。

3 讨论

3.1 4 种 PPD 制剂透皮效果及分析

皮肤剩余量法结果显示 4 种 PPD 制剂透皮效率依次为:PPD 药质体>PPD 原药液>PPD 醇质体>PPD HP- β -CD 包合物。

PPD HP- β -CD 包合物几乎没有透皮吸收,可能是由于包合物中 HP- β -CD 使用浓度高,涂布于皮肤表面,当水分蒸发后形成一层黏性的阻滞层,妨碍了 PPD 的释放及向皮肤表面的扩散。乙醇能促进药物的渗透,但本实验中 PPD 醇质体的透皮效果并不理想(仅有 13.64% 的药量进入皮肤),可能是因为随着乙醇的挥发,留在皮肤表面的醇质体结构性质发生了改变(如囊泡粒径增大、聚集等),很快失去了对透皮的促进作用。PPD 原药液中之所以有 26.45% 的药量进入皮肤,是因为溶液中含有 5% 的 DMSO 和 5% 的聚山梨酯 80,两者作为促渗剂促进了 PPD 的透皮。但长期使用,会影响皮肤的正常屏障功能而产生副作用。

PPD 药质体具有类细胞结构,容易与皮肤表面融合而利于药物吸收^[10],药质体中的磷脂本身也具有一定的促渗作用。PPD 药质体粒径小(只有几十个纳米),利于向皮肤的扩散和渗透。和醇质体不同,药质体中不含乙醇,不存在因乙醇挥发而导致的药质体囊泡结构和性质的变化,从而能较长时间内维持透皮作用。所有这些,使得 PPD 药质体中的药物有约 30.4% 进入了皮肤。进入皮肤的药物,一部分会直接进入血液,剩下一部分可能暂时为真皮和皮下组织所滞留。这部分滞留的药物,绝大部分又可作为药物储库,缓慢释放药物入血而继续发挥治

疗作用。

PPD 极低的溶解度,导致其口服生物利用度很不理想(<25%)。经皮给药是解决这一问题的可能途径之一。经皮给药同时可以避免药物在胃肠道的降解以及肝脏首过效应。本研究对 4 种 PPD 制剂的筛选中,PPD 药质体显示了较好的开发潜力和应用前景。在不加任何促渗剂的情况下能使 30.4% 的药物透入皮肤,而且所用材料具有优良的皮肤相容性和安全性。以此为基础,可以尝试在处方中加入适量氮酮促渗,或加入胆酸盐制备柔性药质体,以便进一步提高 PPD 的透皮效果,以满足 PPD 临床应用的要求。以上实验工作为 PPD 不同剂型给药方式的进一步研究奠定了基础。

3.2 选用在体透皮试验进行研究的原因

本实验直接用大鼠在体实验对 4 种 PPD 剂型的透皮效果进行比较,主要是由于:(1)离体透皮试验难以真实地模拟在体的生理环境,离体试验的结果最终还需要在体实验来验证。(2)Franz 扩散仪体外透皮试验不适合 PPD 的透皮研究。这是因为 PPD 是水不溶性药物(溶解度不到 30 $\mu\text{g/mL}$),HPLC 检测限也比较低。体外透皮试验时,在供给室常规药量情况下,接受池里无法检测到 PPD 的存在,需要加入较高浓度的表面活性剂。而接受池里表面活性剂的存在又能使透皮结果进一步偏离真实的情况。

3.3 皮肤表面剩余量法可以有效地用于制剂的在体透皮试验和处方筛选

国内有若干用皮肤表面剩余量法考察药物透皮效果的研究^[11-12],但其操作难度较大,应用不多。本研究通过反复摸索和改进,每次使用同一个圆筒标记给药区域,将动物处于半麻醉状态固定(以免动物活动蹭到给药区的皮肤),实验结束后将给药区域的皮肤取下洗脱未透过的药物,实验的每一步细心操作,取得了良好的重现性。皮肤表面剩余量法可以避免繁琐的血液和组织样品的处理,以简单的操作评估制剂的透皮效果,为进一步的剂型筛选、处方优化提供了快捷的方式。

参考文献

- [1] 李绪文,林燕飞,郑莹,等. RP-HPLC 法测定西洋参茎叶皂苷酸、碱降解物中 20(S)-原人参二醇的含量[J]. 吉林大学学报:医学版, 2006, 32(2): 353.
- [2] Lee S J, Sung J H, Moon C K. Antitumor activity of a novel ginseng saponin metabolite in human pulmonary adenocarcinoma cells resistant to cisplatin[J]. Cancer Lett, 1999, 144

- (1):39-43.
- [3] Lee S J, Ko W G, Kim J H, *et al.* Induction of apoptosis by a novel intestinal metabolite of ginseng saponin *via* cytochrome c-mediated activation of caspase-3 Protease [J]. *Biochem Pharmacol*, 2000, 60(5): 677-685.
- [4] Hasegawa H, Lee K S, Nagaoka T, *et al.* Pharmacokinetics of ginsenoside deglycosylated by intestinal bacteria and its transformation to biologically active fatty acid esters [J]. *Biol Pharm Bull*, 2000, 23(3): 289-304.
- [5] 李绪文, 林燕飞, 郑莹, 等. RP-HPLC法测定西洋参茎叶皂苷酸、碱降解物中 20(S)-原人参二醇的含量[J]. 吉林大学学报:医学版, 2006, 32(2): 353.
- [6] 韩美华, 陈婧, 陈士林, 等. RP-HPLC法测定 20(S)-原人参二醇药质体药物含及包封率[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(9): 1082-1085.
- [7] 祖强, 赵晓莉, 狄留庆, 等. 不同种类离体皮肤及人工合成膜对川芎贴膏体外透皮试验的影响[J]. 江苏药学与临床研究, 2006, 14(6): 358-360.
- [8] Klimes J, Sochor J, Dolezal P, *et al.* HPLC evaluation of diclofenac in transdermal therapeutic preparations [J]. *Int J Pharm*, 2001, 217(1/2): 153-160.
- [9] McNeely W, Goa K. Diclofenac-potassium in migraine: a review [J]. *Drugs*, 1999, 57(6): 991-1003.
- [10] Touitou E, Dayan N, Bergelson L, *et al.* Ethosomes-novel vesicular carriers for enhanced delivery: characterization and skin penetration properties [J]. *J Controlled Release*, 2000, 65(3): 403-418.
- [11] 刘松青, 唐先哲, 马文秀, 等. 补骨脂酊透皮吸收的实验研究[J]. 华西药理学杂志, 1995, 10(1): 4-8.
- [12] 王建新, 李令媛, 郭力. 如意金黄巴布剂中小檗碱经皮渗透研究[J]. 中草药, 1999, 30(9): 677-679.

(收稿日期 2009-09-15)

蛇床子素对阿霉素心脏毒性的影响

张晓丹¹, 余迎梅^{1*}, 范春兰¹, 张彦卓²

(1. 哈尔滨商业大学药学院, 黑龙江 哈尔滨 150076; 2. 沈阳药科大学药学院, 辽宁 沈阳 110016)

摘要:目的 研究蛇床子素对阿霉素引起的心脏毒性的影响, 并探讨其作用机制。方法 用给 SD 大鼠 ip 阿霉素 (ADR) 的方法复制 ADR 心脏毒性模型。采用颈总动脉插管的方法, 用十六导生理记录仪测定大鼠的血流动力学各项指标, 酶促反应定磷比色法测定心肌肌浆网 (SR) Ca^{2+} -ATP 酶的活性。结果 蛇床子素对 ADR 引起的心脏毒性大鼠的血流动力学有明显改善作用, 能显著升高心肌 SRCa^{2+} -ATP 酶的活性。结论 蛇床子素对 ADR 引起的心脏毒性有保护作用, 其作用机制可能与激活 SR 膜 Ca^{2+} -ATP 酶、促进 Ca^{2+} 储备、降低胞浆中 Ca^{2+} 浓度、阻止 Ca^{2+} 超载有关。

关键词:蛇床子素; 阿霉素; 心脏毒性

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 1674-5515(2009)06-0358-03

The protective effects of osthol against adriamycin-induced cardiotoxicity in rats

ZHANG Xiao-dan¹, YU Ying-mei¹, FAN Chun-lan¹, ZHANG Yan-zhuo²

(1. School of Pharmacy, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China; 2. School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Abstract: **Objective** To observe the effect of osthol (Ost) against chronic cardiotoxicity induced by adriamycin (ADR). **Methods** The cardiotoxicity model was established by ip ADR in SD rats, on which common carotid artery cannulation were later operated. Hemodynamical changes were detected by sixteen channel data recorder system, and the activity of myocardial SR Ca^{2+} -ATPase were determined by enzymatic reaction colorimetric determination phosphorus. **Results** Ost improved the haemodynamical parameters of rats with ADR-induced cardiotoxicity, and increased the activity of myocardial SR Ca^{2+} -ATPase. **Conclusion** Osthol has a protective effect on ADR-induced cardiotoxicity. The mechanism may be related

* 通讯作者 余迎梅 Tel: 13895709861, E-mail: yu_yingmei@163.com