

雷公藤内酯醇生物贴的体外透皮吸收研究

阙慧卿, 林 绥*, 钱丽萍, 彭华毅, 陈 琳**, 郭舜民
福建省医学科学研究院, 福建 福州 350001

摘要: 目的 研究雷公藤内酯醇生物贴的体外经皮吸收特点。方法 利用改良 Franz 扩散池研究雷公藤内酯醇生物贴的经皮吸收特点, 以 HPLC 法测定雷公藤内酯醇的经皮吸收量。结果 雷公藤内酯醇生物贴中的雷公藤内酯醇在 24 h 内以一级动力学经皮渗透, 累积渗透量为 $2.057\ 3\ \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。结论 雷公藤内酯醇生物贴中雷公藤内酯醇的体外透皮吸收效果优于文献报道的巴布剂。

关键词: 雷公藤内酯醇生物贴; 雷公藤内酯醇; 体外透皮吸收; 高效液相色谱

中图分类号: R286.02 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674 - 5515(2012)03 - 0236 - 03

Percutaneous absorption of triptolide biological patch *in vitro*

QUE Hui-qing, LIN Sui, QIAN Li-ping, PENG Hua-yi, CHEN Lin, GUO Shun-min
Institute of Medical Sciences of Fujian Province, Fuzhou 350001, China

Abstract Objective To study the percutaneous absorption characteristic of triptolide biological patch *in vitro*. **Methods** Franz diffusion cell was used to study the percutaneous absorption characteristic of triptolide biological patch, and HPLC was used to determinate the percutaneous absorption amount of triptolide. **Results** The percutaneous penetration of triptolide in 24 h was consistent with first-order kinetic model and the cumulative release in 24 h was $2.057\ 3\ \mu\text{g}/\text{cm}^2$. **Conclusion** The transdermal characteristics *in vitro* of triptolide biological cataplasma is better than plaster reported in the literature.

Key words: triptolide biological patch; triptolide; percutaneous absorption *in vitro*; HPLC

雷公藤内酯醇又称雷公藤内酯、雷公藤甲素, 是雷公藤的主要活性成分之一。作为免疫抑制药物, 雷公藤内酯醇应用于许多自身免疫性疾病的治疗。由于雷公藤内酯醇的生理活性强, 具有显著的抗炎、抗肿瘤、抗生育及免疫调节作用, 在临床上得到了广泛的应用。透皮贴剂又名透皮给药系统, 这类新型制剂可避免肠胃环境对药效的干扰和肝脏首关效应, 维持稳定、持久的血药浓度, 提供可预定的和较长的作用时间, 降低药物的不良反应, 提高疗效, 减少给药次数, 给药方便, 提高患者的顺应性等优点^[1]。将雷公藤内酯醇制成生物贴应用于类风湿性关节炎的治疗, 意在通过改变给药途径, 降低雷公藤内酯醇的不良反应, 提高疗效。本实验通过 Franz 扩散池模拟皮肤的环境, 研究雷公藤内酯醇生物贴

的体外经皮吸收特点及其释放规律, 考察该制剂的生物利用度, 以期为雷公藤内酯醇生物贴的研究开发提供依据。

1 仪器与试药

LC—20AT 型高效液相色谱仪 (日本岛津公司), TK—20A 型透皮扩散实验仪 (上海锴凯科技贸易有限公司), 改良 Franz 扩散池, AL204 电子分析天平 (梅特勒-托利多仪器上海有限公司), HH—2 数显恒温水浴锅 (金坛市江南仪器厂), KQ2200E 超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司)。

雷公藤内酯醇 (质量分数为 99.48%, 福建省医学科学研究院药物研究院), 雷公藤内酯醇生物贴 (80 $\mu\text{g}/\text{贴}$, 4.2 cm \times 3.2 cm, 福建省医学科学研究院), 甲醇、乙腈 (色谱纯, 西陇化工股份有限公司),

收稿日期: 2012-02-14

基金项目: 福建省科技重大专项 (2009YZ0001-1-3); 福建省医学创新项目 (2009—CX—16); 福建省省属公益类科研院所基本科研专项 (2011R1034-3)

作者简介: 阙慧卿 (1979—), 女, 福建永定人, 助理研究员, 学士, 研究方向: 中药与天然药物化学。

*通讯作者 林 绥 Tel: 13605948318 E-mail: linsui_syy@sina.com.cn

**福建省卫生技术学院 2012 届毕业生

氯化钠(国药集团化学试剂有限公司),生理盐水(福建省医学科学研究所)。

昆明种普通级小鼠,体质量 18~22 g,福建省疾病预防控制中心动物房提供。

2 方法与结果

2.1 雷公藤内酯醇的 HPLC 法测定

2.1.1 色谱条件^[2] 色谱柱为 Ultimate XB C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.0 mm, 5 μm),流动相为乙腈-水(3:7),检测波长为 218 nm,柱温为室温,进样量为 20 μL。

2.1.2 标准曲线的制备 精密称取雷公藤内酯醇 10 mg,置 10 mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,得 1 mg/mL 储备液。用移液管精密移取上述储备液 0.2 mL 置 5、10、25、50、100、200 mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,0.45 μm 微孔滤膜滤过,按上述 HPLC 色谱条件分别进样 20 μL 测定。以雷公藤内酯醇的质量浓度为横坐标,相应峰面积积分为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $A=3\ 634.5\ C-2\ 290.8$, $r=0.999\ 9$,表明雷公藤内酯醇在 1.000~100.000 μg/mL 线性关系良好。

2.1.3 精密度试验 精密吸取同一供试品溶液(8 h 采样制备后)10 μL,进样,按上述色谱条件测定雷公藤内酯醇峰面积,连续操作 6 次,计算得雷公藤内酯醇峰面积积分值的 RSD 为 0.83%。

2.1.4 稳定性试验 取同一供试品溶液(8 h 采样),分别于制备后 0、1、2、4、8、24 h 内测定雷公藤内酯醇峰面积积分值,每次 10 μL,计算得雷公藤内酯醇峰面积积分值的 RSD 为 1.92%。结果表明供试品溶液在 24 h 内性质稳定。

2.1.5 回收率试验 精密吸取 6 份 8 h 采样的 0.073 5 μg/mL 样品溶液 2 mL,分别精密加入 1.000 μg/mL 雷公藤内酯醇对照品溶液 0.2 mL,蒸干,残渣用色谱醇甲醇定容至 2 mL 量瓶,进行 HPLC 法测定,计算得平均回收率为 99.21%,峰面积积分值的 RSD 为 1.03%。

2.1.6 样品测定 将样品液置于水浴上蒸除水分,用甲醇定容至 1 mL 量瓶,微孔滤膜滤过,直接进样 20 μL,色谱图见图 1,采用外标法计算雷公藤内酯醇的质量浓度。

2.2 体外透皮试验

2.2.1 离体鼠皮的制备 取小鼠 6 只,用电动剃毛刀去除腹部毛,温水洗净,自然饲养 1 d,于次日实验前断颈处死,立即剥离腹部皮肤,去除皮下脂肪

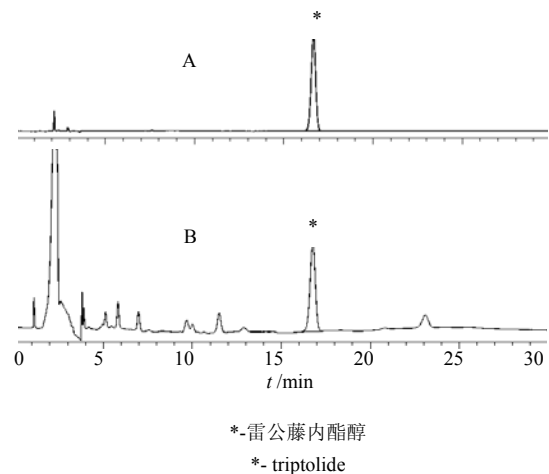


图 1 雷公藤内酯醇对照品(A)和接收液(B)的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC chromatograms of triptolide reference substance (A) and sample solution (B)

和结缔组织,用生理盐水洗净、铺平、密封冷冻于冰箱中,供一周内使用。实验前检查鼠皮的完整性,如有破损则废弃。

2.2.2 体外透皮实验^[2] 将小鼠腹部皮肤置 37 °C 生理盐水中解冻,裁剪成合适的大小后固定在装有磁力搅拌子的立式改良 Franz 扩散池上,真皮层面向接受池,角质层面向供给池。将裁剪好的雷公藤内酯醇生物贴贴于角质层面上,使之与皮肤表面密切接触,将供给池和接收池连接并固定好,在接收池内加入预热至 37 °C 的新鲜生理盐水甲醇溶液^[3](使用前超声脱气),排除气泡,使液面与皮肤密切接触,有效渗透面积(S)为 2.92 cm²,接收池体积为 18 mL。开动恒温(37±1) °C 水浴循环和磁力搅拌器,磁力搅拌器恒速搅拌速率为 100 r/min 时开始计时。在 1、2、4、8、24 h 从接收池中取出 2 mL 液体,并及时补充等量 37 °C 的新鲜接收液。取出接收液,蒸干,残渣用色谱纯甲醇定容至 2 mL 量瓶,进行 HPLC 法测定,计算累积透过量。

2.2.3 数据处理 计算离体鼠皮经皮渗透实验单位面积的累积透过量 $Q^{[4]}$ 。以 Q_n 为纵坐标,时间(t)为横坐标,绘制体外透皮释药曲线,见图 2。

$$Q_n = \frac{C_n V + \sum_{i=1}^{n-1} C_i V_s}{S}$$

C_n 为第 n 个时间点的被测液的质量浓度, C_i 为第 i 个时间点的被测液的质量浓度, V 为溶出介质体积, V_s 为取样体积, S 为有效接触面积

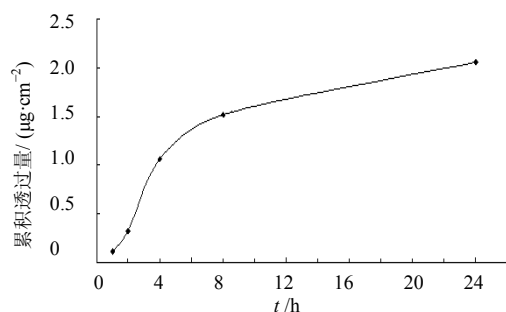


图 2 雷公藤内酯醇生物贴的透皮吸收曲线

Fig. 2 Percutaneous absorption curve of triptolide biological patch

可见雷公藤内酯醇生物贴 24 h 单位面积累积透过量平均为 $(2.0573 \pm 0.0761) \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。沈子龙等^[5]研究表明雷公藤巴布剂中雷公藤甲素在 48 h 内仅有 16.8% 被透皮吸收。本课题通过在处方中加入促渗剂, 改进剂型等手段, 促进雷公藤内酯醇的透皮吸收, 使雷公藤内酯醇在 24 h 内累积透过量为 34.56%。

按照常用的 3 种释放模型拟合, Q 与 t 之间相关的函数关系有零级速率模型、一级速率模型和 Higuchi 模型^[6], 根据拟合优度 (R^2) 来判定曲线拟合情况。Excel 拟合得零级速率模型拟合方程 $Y=0.0745t-0.429$, $R^2=0.7682$; 一级速率模型拟合方程 $Y=0.6439 \ln t-0.0654$, $R^2=0.9741$; Higuchi 模型拟合方程 $Y=0.4924t^{1/2}-0.1856$, $R^2=0.8951$ 。

可见雷公藤内酯醇生物贴在 50% 生理盐水甲醇溶液中的体外透皮用零级动力学方程、一级动力学方程和 Higuchi 方程拟合, 以一级动力学拟合优度比较好。药物释放曲线分成两个阶段, 即释药是按时间变化先多后少的非恒速释放药物。在前半段, 药物迅速透过皮肤, 接收液质量浓度较快地达到平衡, 提示用药后可以得到平稳的血药浓度, “峰谷”波动较小。

3 讨论

体外透皮试验中, 小鼠皮肤要与接收液密切接触。取样点和取样量必须经过预实验筛选后, 严格设定, 不合理的设计会导致实验数据失真。取样后应及时补充新鲜等温等量的接收液, 接收液使用前应进行超声脱气处理, 磁搅拌子转速以 100 r/min 为宜。

实验采用零级、一级和 Higuchi 模型拟合方程对雷公藤内酯醇生物贴的体外透皮数据进行拟合, 操作简便, 拟合出的数据切实、可行。雷公藤内酯醇生物贴中的药物渗透量随着时间呈递增过程, 表明雷公藤内酯醇生物贴中的雷公藤内酯醇可以透过皮肤而发挥作用。

要控制雷公藤内酯醇生物贴中雷公藤内酯醇的累积透过量, 生物贴处方中促渗剂、保湿剂等的合理应用是关键, 生物贴和皮肤接触的有效面积也密切相关。另外本实验为适应仪器对透皮研究的需要, 将雷公藤内酯醇生物贴的规格制成 $4.2 \text{ cm} \times 3.2 \text{ cm}$, 临床应用时, 应根据需要, 调整贴片的大小和含药量, 以保证累积透过量能达到理想治疗浓度。

参考文献

- [1] 阙慧卿, 陈梦玲, 钱丽萍, 等. 贴剂溶出度的研究进展 [J]. 药物评价研究, 2011, 34(5): 388-391.
- [2] 林 绥, 邓思珊, 阙慧卿, 等. HPLC 法测定雷公藤内酯醇生物贴中雷公藤内酯醇 [J]. 中草药, 2010, 41(9): 1478-1480.
- [3] 陈凌云, 张卫兵, 张丽萍. 类风关巴布剂体外透皮吸收研究 [J]. 医药导报, 2004, 23(7): 444-445.
- [4] 李 晋, 胡晋红, 朱全刚, 等. 酮洛芬巴布剂的研制及体外透皮研究 [J]. 药学服务与研究, 2006, 6(5): 340.
- [5] 沈子龙, 李 爽, 谢启昆. 雷公藤巴布剂透皮吸收研究 [J]. 中国药科大学学报, 1994, 25(3): 141-144.
- [6] 王志强, 吴继宇, 张秀华. 用 Excel 软件对溶出数据进行多种曲线拟合和处理 [J]. 海峡药学, 2006, 18(1): 47-49.