

灯盏花素经鼻给药吸收特性研究

石森林¹, 徐莲英², 毛展凯¹, 张韩清³, 李万里¹

(1. 浙江中医药大学药学院, 浙江 杭州 310053; 2. 上海中医药大学中药学院, 上海 201203;

3. 金华市中心医院, 浙江 金华 321000)

摘要:目的 研究灯盏花素的离体、在体经鼻吸收特性,为灯盏花素的鼻腔给药制剂设计提供依据。方法 采用V-C扩散池,以新鲜犬鼻黏膜为渗透屏障,以含灯盏花乙素0.25、0.50、1.25 mg/mL的灯盏花素PBS液(pH 6.5)为释放液,以空白PBS为接收液,进行渗透试验;采用大鼠鼻腔循环灌流法,以1.01、1.70、4.48 mg/mL灯盏花素PBS溶液(pH 6.5)作为鼻腔循环液,HPLC法测定灯盏乙素,进行在体鼻黏膜吸收试验。结果 灯盏花素高、中、低质量浓度组的犬鼻黏膜渗透系数分别为 3.6×10^{-5} 、 1.272×10^{-3} 、 1.856×10^{-3} cm/min ($n=3$)。随着灯盏花素的质量浓度增加,其渗透系数呈剂量依赖性增加;高、中、低质量浓度灯盏花素的大鼠在体吸收速度常数分别为 4.5×10^{-3} 、 2.3×10^{-3} 、 1.7×10^{-3} min⁻¹,随质量浓度的增加,鼻黏膜吸收量逐渐增加,但其吸收速度常数较小。结论 灯盏花素可经鼻吸收,质量浓度对其吸收的影响较大,适合制备成经鼻给药的新制剂。

关键词:灯盏花素;灯盏花乙素;鼻腔循环灌流;鼻黏膜吸收;吸收速度常数

中图分类号:R286.1

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2008)12-1821-03

灯盏花素为灯盏花的主要有效成分,具有改善脑微循环,增加脑血流量,降低血管阻力,抗缺血、缺氧,抗血小板聚集、抑制血管内凝血、促进纤溶活性等功能,临床主要用于治疗脑血栓形成、脑栓塞等脑血管意外所致完全性及不完全性瘫痪。鼻黏膜给药具有生物利用度高、吸收快、给药方便,且能向脑内递药等优点^[1]。与口服给药相比吸收快,还因避免了首过效应而生物利用度较高;与注射给药相比给药方便,不良反应少,并具有一定的脑内靶向分布特性。故鼻黏膜给药对脑部疾病具有潜在的治疗优势。为探讨灯盏花素经鼻给药治疗脑血管疾病的可行性,本实验进行了灯盏花素经鼻吸收特性的研究。

1 材料和仪器

灯盏乙素对照品由中国药品生物制品检验所提供;灯盏花素购于云南玉溪万方天然药物有限公司;乙腈、甲醇、磷酸、丙二醇等试剂均为色谱纯;其他试剂均为分析纯。

V-C扩散池(浙江大学材料化工学院玻璃车间定制);BT00-100M恒流泵(保定兰格恒流泵公司);Agilent 1100高效液相色谱仪、UVD检测器(美国Agilent公司);PL5124型纯水机,美国PALL公司;CQ250型超声波清洗器(上海超声波仪器厂);AB-204-N电子天平(梅特勒-托利多)。

SD大鼠,雄性,体质量250~300 g,浙江中医药大学实验动物中心;犬,浙江中医药大学实验动物

中心。

2 方法与结果

2.1 灯盏乙素的HPLC测定方法的建立

2.1.1 供试品溶液的制备:灯盏花素真空干燥24 h后,取约5 mg,精密称定,置于50 mL量瓶中,用pH 6.5 PBS溶解并稀释至刻度,密塞,摇匀。精密吸取1 mL,置于5 mL量瓶中,用渗透液稀释至刻度,摇匀,即得。

2.1.2 对照品溶液的制备:灯盏乙素对照品真空干燥24 h后,取约5 mg对照品,精密称定,置于50 mL量瓶中,用无水乙醇溶解并稀释至刻度,密塞,摇匀,即得对照品储备液。精密吸取此对照品储备液2 mL于10 mL量瓶中,用流动相稀释至刻度,密塞,摇匀,即得。置4℃冰箱保存。

2.1.3 色谱条件:色谱柱为Zorbax XDB C₁₈(150 mm×3.9 mm, 5 μm);流动相:乙腈-水-磷酸(20:80:0.2);检测波长:327 nm;柱温:室温;体积流量:1 mL/min。色谱图见图1,表明色谱该条件可以用于灯盏乙素的测定。

2.1.4 标准曲线的制备:精密吸取灯盏乙素对照品储备液一定量,依次配成1~40 μg/mL对照品液,进样20 μL,测定峰面积。以峰面积为纵坐标,进样量为横坐标拟合标准曲线,得回归方程 $Y=3\,049.111\,6\,X$ ($r=0.999\,9$),结果表明,灯盏乙素在22.5~540 ng时,峰面积与进样量有良好的线性关系。

收稿日期:2008-04-22

基金项目:国家中医药管理局项目(06-07ZP24);浙江省科技攻关项目(2003C33017)

作者简介:石森林,男,博士,副教授,硕士生导师。Tel:(0571)86613524 E-mail:pjstone@163.com

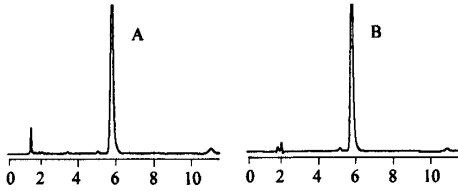


图1 灯盏乙素和供试品HPLC图

Fig. 1 HPLC Chromatogram of scutellararin (A) and breviscapine (B)

2.1.5 精密度试验:准确吸取3个不同质量浓度的灯盏乙素对照品溶液20.0 μL ,各连续进样6次,测定峰面积,结果其RSD分别为0.227%、0.226%、0.143%。

2.1.6 稳定性试验:取同一供试品溶液,分别在0、0.5、1、2、4、8、24 h进样20 μL ,测定灯盏乙素峰面积。结果其峰面积RSD为0.349%,可见样品在24 h内稳定性良好。

2.1.7 回收率试验:精密称取5份一定量灯盏乙素对照品,加入渗透液中,制备供试品溶液,进样测定,结果灯盏乙素的平均回收率为99.31%,RSD为0.592%。

2.2 离体吸收研究

2.2.1 鼻黏膜的剥制^[2]:将宰杀2 h的犬鼻部取下,切开鼻腔,暴露出鼻中隔及两侧鼻甲骨,将覆盖在其上的鼻腔薄膜剥离,用生理盐水洗净薄膜上残留的血迹,再将薄膜放在一片铝箔上,铺开,然后置入低温冰箱中冷冻、储藏,一周内使用。

2.2.2 V-C扩散池的安装与操作:取离体低温保存的新鲜鼻黏膜固定于扩散池的结合部,黏膜的浆膜面向接受池,供给池中加入一定质量浓度的被试

药物的供试液,接受池内加pH 6.5的PBS 5.0 mL。扩散池水浴外套与超级恒温水浴槽相接,维持整个系统的温度在 $(37 \pm 0.5)^\circ\text{C}$,加入搅拌子,恒速搅拌。于设定时间从接收池取样0.2 mL,同时补充等体积PBS。所取样品经3 000 r/min离心20 min,取上清液,HPLC法测定灯盏乙素质量浓度($C_{\text{测}}$)。

2.2.3 渗透液处理:新鲜鼻黏膜固定于扩散池结合部,黏膜的浆膜面向接受池,供给池中加入空白(不含药物)供试液,接受池内加入接受液(pH 6.5 PBS),于 $(37 \pm 0.5)^\circ\text{C}$,恒速搅拌24 h,接受液3 000 r/min离心20 min,上清液过膜,备用。

2.2.4 数据处理:按下式计算校正药物浓度($C_{\text{校正}}$)、单位面积累积渗透量(Q)、稳态透过速率(J_s)、渗透系数(P)。以不同时间的 Q 对时间 t 做图,该图的直线部分斜率即为 J_s 。

$$C_{\text{校正}} = C_{\text{测}} + 0.2/5 \sum C_p$$

$$Q = C_{\text{校正}} \times V / A$$

$$P = J_s / C_0$$

$\sum C_p$:各取样前各点的测定浓度之和, A 为扩散池横截面积, V 为接受池中接受液体积, C_0 为供给池中供试药物浓度

2.3 灯盏花素的鼻黏膜吸收:以含灯盏乙素0.25、0.50、1.25 mg/mL灯盏花素PBS液(pH 6.5)为释放液,空白PBS为接收液,进行渗透试验,于不同时间点取样,测定,计算,结果见表1。根据试验结果,计算各组 P ,结果低、中、高质量浓度组的灯盏花素 P 分别为 3.6×10^{-5} 、 1.272×10^{-3} 、 1.856×10^{-3} cm/min ($n=3$)。实验结果表明,灯盏花素的离体犬鼻黏膜渗透试验的渗透系数与质量浓度有关,各组两两比较均有显著性差异。

表1 灯盏花素离体犬鼻黏膜吸收累积渗透量($n=3$)

Table 1 Accumulation permeability amount of membrana pituiteson absorption for breviscapine in dog *in vivo* ($n=3$)

质量浓度/ (mg · mL ⁻¹)	Q/($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$)							
	0 min	10 min	20 min	30 min	60 min	90 min	120 min	180 min
0.25	0	0.075±0.034	0.216±0.065	0.438±0.066	0.657±0.074	0.864±0.196	1.048±0.101	1.609±0.095
0.50	0	3.885±1.058	12.112±1.937	17.679±4.184	30.070±1.697	58.512±3.081	82.095±3.548	123.538±2.222
1.25	0	9.708±1.456	18.331±8.295	33.847±5.475	87.827±24.194	183.680±32.261	273.037±25.924	436.268±12.497

2.4 灯盏花素大鼠鼻腔在体吸收^[3,4]

2.4.1 洗出液的收集:取50 mL pH 6.5的PBS,按大鼠在体鼻循环法操作,流速2.5 mL/min,持续循环30 min,即得大鼠鼻腔洗出液。将洗出液在37 $^\circ\text{C}$ 恒温水浴中平衡5 min,备用。

2.4.2 洗出液的稳定性:精密称取灯盏花素约1、1.7、2.5 mg各1份,用大鼠鼻腔洗出液配制得101.97、171.42、242.64 $\mu\text{g/mL}$ 灯盏花素溶液,在

37 $^\circ\text{C}$ 恒温水浴中孵育,在各规定时间点,取样,测定,结果见表2。表明灯盏花素在大鼠鼻腔洗出液中较稳定,8 h内进行循环灌流实验,不影响残余药液的测定。

2.4.3 大鼠鼻腔循环灌流法:大鼠腹腔注射20%乌拉坦按照0.5 mL/100 g麻醉,仰卧固定于平板上,在颈部做切口,暴露气管和食管。取聚乙烯管2支,一支插入气管,另一支的一端插入食管,直至鼻腔后

部,用胶黏剂将鼻腔与口腔的鼻咽通道封闭,以防药液从口腔中流失,管子的另一端与药液接触,将盛有药液的循环池以(37±1)℃水浴恒温,蠕动泵使药液经鼻腔循环,循环液流速 2.5 mL/min。定时从循环池中取药液测定。

表 2 灯盏花素在大鼠鼻腔洗出液中的稳定性

Table 2 Stability of breviscapine in rat nasal eluate

试验号	灯盏乙素/(μg·mL ⁻¹)				
	0 h	8 h	18 h	24 h	48 h
1	101.97	100.81	97.02	96.14	91.88
2	171.42	171.02	169.42	164.0	161.09
3	242.64	242.01	241.91	233.14	230.23

2.4.4 数据处理:药物经鼻吸收进入大鼠体内,循环液中药物以一级速度消除;整个实验过程中,鼻腔的分泌和重吸收可以忽略不计,循环液体积始终不

表 3 不同质量浓度的灯盏花素在体鼻黏膜吸收量

Table 3 Nasal absorption amount of breviscapine at different concentration

质量浓度/ (mg·mL ⁻¹)	灯盏乙素/mg						
	0 min	10 min	20 min	30 min	60 min	90 min	120 min
1.01	0	0.563±0.054	0.978±0.357	1.348±0.076	1.683±0.119	2.173±0.213	3.117±0.084
1.70	0	1.318±0.083	1.904±0.065	2.441±0.321	2.782±0.506	3.451±0.644	4.4731±0.083
4.48	0	1.717±0.500	2.893±0.907	4.025±0.576	4.911±0.457	6.662±0.782	7.919±0.512

表 4 灯盏花素在体鼻黏膜吸收速度比较

Table 4 Comparison on velocity of membrana pituitosa absorption for breviscapine

质量浓度/ (mg·mL ⁻¹)	吸收方程	<i>r</i>	吸收速度常数 (×10 ⁻³ min ⁻¹)
1.01	lnC=-0.004 5 t-0.018 7	0.987 8	4.5±0.058
1.70	lnC=-0.002 3 t+0.472 4	0.956 5	2.3±0.208
4.49	lnC=-0.001 7 t+1.470 1	0.974 2	1.7±0.058

3 讨论

鼻黏膜给药研究方法主要有离体法、在体法和体内法。离体法一般采用 V-C 扩散池法或 Ussing 扩散池法^[5],研究鼻腔内药物吸收机制;主要采用兔、犬和羊等鼻黏膜,但渗透系数不同,可能与各动物黏膜组织结构不同有关。因此选择动物模型,应考虑种属差异。灯盏花素离体犬鼻黏膜渗透试验结果表明黏膜渗透系数随着浓度提高而增加。在体法主要采用 Hirai 氏鼻腔循环灌流法,研究药物鼻黏膜吸收速率与时间的关系及吸收机制。药物的理化性质是影响其鼻黏膜吸收的主要因素,其中油水分配系数尤为重要^[6],尽管鼻黏膜除亲脂性通道外,还存在亲水性通道^[7],但以亲脂性通道为主,因此脂溶性药

变,根据 $\ln C = \ln C_0 - kt$ 计算吸收速度常数(*k*),式中 *C*₀ 为循环液初始质量浓度,*C* 为 *t* 时样品质量浓度。

2.4.5 在体鼻黏膜吸收结果:配制 pH 6.5 的 PBS,用 NaCl 调节渗透压至与 0.205 mol/L NaCl 相当,以其配制质量浓度为 1.01、1.70、4.48 mg/mL 灯盏花素溶液,作为鼻腔循环液,进行在体鼻黏膜吸收试验(*n*=3)。每个质量浓度取 8 mL 进行鼻腔循环,分别于循环后 10、20、30、60、90、120 min 定时取样 200 μL,同时补加等量含 NaCl 的空白 PBS,HPLC 法检测残留药物质量浓度,计算透过量 *M*,并将测得的浓度值按一级速度方程回归,结果见表 3、4。实验结果表明:灯盏花素在不同质量浓度条件下,随质量浓度的增加,鼻黏膜吸收逐渐增加,但其吸收速度常数较小。

物易吸收。本研究发现灯盏花素鼻黏膜吸收随浓度增加而逐渐增加,但其吸收速度常数较小。

本研究发现灯盏花素可经鼻吸收,但灯盏花素在体吸收速度与黏膜渗透系数较小,可能与灯盏花素在 pH 4 以上,油水分配系数小有关,提示亲脂性通道是其经鼻吸收的主要途径。

参考文献:

- [1] 蒋新国.药物的鼻黏膜膜吸收[J].中国新药杂志,2003,12(11):902.
- [2] 崔景斌,奚念珠,蒋新国.鼻腔作为全身给药途径的研究[J].中国医院药学杂志,1998,18(11):493.
- [3] McMartin C, Hutchinson L E F. Analysis of structural requirements for the absorption of drug and macromolecules from the nasal cavity [J]. *J Pharm Sci*, 1987,76(7):535.
- [4] Fish A N, Brown K. The effect of molecular size on the nasal absorption of water-soluble compounds in the albino rat [J]. *J Pharm Pharmacol*, 1987,39:357.
- [5] Bechgard E, Gizurason S, Jorgensen L, et al. The viability of isolated rabbit nasal mucosa in the Ussing chamber, and the permeability of insulin across the membrane [J]. *Int J Pharm*, 1992, 87:125.
- [6] 陆彬.药物新剂型及新技术[M].北京:人民卫生出版社,1998.
- [7] Duchateau G, Zuidema J. Nasal absorption of alprenolol and metoprolol [J]. *Int J Pharm*, 1986, 34:131.