

止痹痛巴布剂体内外透皮给药的相关性评价

王庆月¹, 唐斌斌^{1*}, 杜书君¹, 郝保华²

1. 阳谷县人民医院, 山东 阳谷 252300

2. 西北大学生命科学学院, 陕西 西安 710069

摘要: **目的** 考察止痹痛巴布剂体内外透皮给药的相关性。**方法** 体外试验采用单室扩散池, HPLC 法检测接收池中青藤碱的质量浓度; 体内试验检测大鼠的血药浓度, 采用 W-N 法计算累积吸收质量浓度。对体外累积透过质量浓度与体内累积吸收质量浓度进行线性回归。**结果** 回归方程为 $Y=0.097\ 24\ X+0.323\ 91$, $r=0.955\ 1$, 体内外相关性非常显著 ($\alpha=0.001$)。**结论** 此方法可用于评价透皮给药系统体内外相关性。

关键词: 止痹痛巴布剂; 透皮给药系统; 体内试验; 体外试验; 相关性; W-N 法; 青藤碱

中图分类号: R283.6; R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)03-0484-03

Correlation evaluation of transdermal delivery *in vitro* and *in vivo* with Zhibitong Cataplast

WANG Qing-yue¹, TANG Bin-bin¹, DU Shu-jun¹, HAO Bao-hua²

1. Yanggu People's Hospital, Yanggu 252300, China

2. College of Life Sciences, Northwest University, Xi'an 710069, China

Abstract: **Objective** To investigate the correlation of transdermal delivery *in vitro* and *in vivo* with Zhibitong Cataplast. **Methods** Single-chamber diffusion cell was used and sinomenine concentration was determined by HPLC *in vitro*. *In vivo* tests, W-N method was applied to calculating the cumulative absorption of concentration by plasma drug concentration in rats. And the linear regression equation was figured through the concentration of cumulative *in vitro* and the concentration of cumulative absorption *in vivo*. **Results** The regression equation was $Y=0.097\ 24\ X+0.323\ 91$, $r=0.955\ 1$ and there was a high correlation between *in vitro* transdermal delivery and *in vivo* percutaneous absorption. **Conclusion** This method can be used to evaluate the correlation between *in vitro* and *in vivo* transdermal delivery.

Key words: Zhibitong Cataplast; transdermal delivery system; *in vitro* test; *in vivo* test; correlation; W-N method; sinomenine

止痹痛巴布剂是在阳谷县人民医院传统经验方剂的基础上改变剂型而制成的透皮给药制剂, 由青风藤、当归、川芎、透骨草、红花、元胡、川乌、草乌、桂枝、樟脑、冰片等中药与适宜的水溶性高分子材料组成, 用于治疗颈椎病、肩周炎等疾病, 作用安全, 疗效显著。

目前, 对于巴布剂的体外释药和体内药动力学研究较多^[1-4], 但关于体内外透皮给药的相关性研究几乎为空白。体外透皮试验可以一定程度上预测体内行为, 为了减少体内研究数量和降低新药研发的成本, 部分研究者集中大部分精力进行体外试验, 但

如果体内外透皮给药的相关性不好, 那么体外试验的研究结果将失去意义, 因此开发透皮治疗系统应重视体内外透皮给药试验的相关性评价。本实验以青风藤的主要成分青藤碱为指标, 考察止痹痛巴布剂的体内外透皮给药试验的相关性, 以期建立可用于评价透皮给药系统体内外相关性的方法。

1 材料

Wistar 大鼠, 体质量 200~250 g (山东医科大学实验动物中心), 动物许可证号: (鲁) 2008004。

HL—2 恒流泵 (郑州南北仪器设备有限公司); 78—1 磁力加热搅拌器 (江苏金坛环宇科学仪器厂);

收稿日期: 2010-06-21

作者简介: 王庆月 (1970—), 女, 山东聊城人, 主管药师, 从事化学药管理及临床不良反应统计工作。

Tel: 13863544859 E-mail: w700421@sina.com

*通讯作者 唐斌斌 Tel: 13869504970 E-mail: tangbinbin515@163.com

改良的 Franz 单室扩散池 (有效扩散面积 $A_e=3.46\text{ cm}^2$, 容积 $V=25.0\text{ mL}$); 高效液相色谱仪 (Waters: 1525 型泵, 2487 型检测器); TGL—16 台式离心机 (上海安亭科学仪器厂)。

止痒痛巴布剂 (规格: $5\text{ cm}\times 10\text{ cm}$, 初粘力: 能粘住的钢球号 ≥ 14 , 持粘力: 垂直方向上在 200 g 重物作用下 30 min 位移值 $\leq 0.3\text{ cm}$); 青藤碱对照品 (质量分数 $\geq 99\%$, 陕西赛德高科生物公司); 肝素钠 (药用级); 氯仿、甲醇、乙二胺 (色谱纯); 水为蒸馏水。

2 方法与结果

2.1 体外透皮试验

取体质量合格的健康 Wistar 大鼠, 脱颈处死, 剪净腹部毛, 剥离此处皮肤, 剔除皮下脂肪组织, 用蒸馏水冲洗干净后检查, 选用角质层完好的皮肤备用。将处理好的皮肤角质层一面与止痒痛巴布剂紧密结合, 接收池中加满生理盐水作为接收液; 将皮肤的真皮层与接收池固定, 把单室扩散池放置在调温恒控磁力搅拌器上, 并以恒定速度搅拌, 同时保持恒温在 $(37\pm 0.5)\text{ }^\circ\text{C}$; 分别于 0、1、2、4、6、8、10、12、16、20、24、28 h 取样 1 mL , 经 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过, 得样品, 取 $20\text{ }\mu\text{L}$ 进样测定, 重复 3 次。

2.2 体内透皮试验

取体质量合格的健康 Wistar 大鼠固定于实验台上, 剪净腹部毛后, 贴敷止痒痛巴布剂, 并分别于贴敷后 0、1、2、4、6、8、10、12、16、20、24、28 h 取血 1.0 mL , 置经肝素处理过的离心管中, $3\text{ }000\text{ r/min}$ 离心 0.5 h , 抽取血浆 0.5 mL , 加入 0.1 mol/L NaOH 溶液 0.2 mL , 混匀; 用氯仿萃取 2 次, 每次 5 mL , 合并萃取液, 蒸干; $100\text{ }\mu\text{L}$ 甲醇溶解残渣, 取 $20\text{ }\mu\text{L}$ 进样测定, 重复 3 次。每次取血后注射补充相应量的生理盐水。

2.3 色谱条件

色谱柱为 Diamonsil C_{18} 柱 ($200\text{ mm}\times 4.6\text{ mm}$, $5\text{ }\mu\text{m}$), 流动相为甲醇-[水-乙二胺 ($300:1$)] ($52:48$), 检测波长 262 nm , 体积流量 1.0 mL/min 。

2.4 体外透皮试验线性方程及方法学考察

2.4.1 体外透皮试验线性方程 精密称取干燥至恒定质量的青藤碱对照品 3.76 mg , 置 25 mL 量瓶中, 加流动相溶解定容至刻度。分别精密吸取 0.1 、 0.5 、 2.0 、 5.0 、 8.0 、 10.0 mL 置 10 mL 量瓶中, 用流动相定容至刻度, 得到不同质量浓度的系列对照品溶

液。取上述溶液各 $20\text{ }\mu\text{L}$, 进样测定, 记录峰面积, 以峰面积值为纵坐标, 青藤碱质量浓度为横坐标, 进行线性回归, 得回归方程 $Y=16\text{ }359\text{ }X+43\text{ }541$, $r=0.999\text{ }9$, 表明青藤碱在 $1.505\sim 150.5\text{ }\mu\text{g/mL}$ 线性关系良好。

2.4.2 精密度试验 精密吸取 1 h 的体外供试品溶液, 每次进样 $10\text{ }\mu\text{L}$ 测定; 1 d 内重复测定 6 次, 结果青藤碱日内 RSD 为 0.93% ; 每天各测定 1 次, 共 6 d , 结果青藤碱日间 RSD 分别为 1.15% 。

2.4.3 重现性试验 精密平行吸取 1 h 的体外供试品溶液 5 份, 每份 $10\text{ }\mu\text{L}$, 进样分析, 样品中青藤碱质量浓度的 RSD 为 1.49% 。

2.4.4 回收率试验 精密吸取 1.0 mL 青藤碱质量浓度为 $10.6\text{ }\mu\text{g/mL}$ 的样品 9 份, 分别加入 150 、 75 、 $1.5\text{ }\mu\text{g/mL}$ 青藤碱对照品溶液 $10\text{ }\mu\text{L}$, 配制成高、中、低 3 个青藤碱质量浓度的供试品溶液各 3 份, 各进样 $10\text{ }\mu\text{L}$, 9 份样品平均回收率为 99% , RSD 为 2.86% , 结果符合测定要求。

2.5 体内透皮试验线性方程及方法学考察

2.5.1 体内透皮试验线性方程 精密量取大鼠空白血清 0.2 mL , 共 5 份, 分别置 5 mL 带塞肝素化的离心管中。用流动相配制质量浓度分别为 0.3 、 1.0 、 4.0 、 8.0 、 $16.0\text{ }\mu\text{g/mL}$ 青藤碱对照品溶液; 分别精密吸取 $50\text{ }\mu\text{L}$ 各质量浓度的青藤碱对照品溶液, 加入上述大鼠空白血浆中, 混匀; 再加入 0.1 mol/L NaOH 溶液 0.2 mL , 混匀; 用氯仿萃取 2 次, 每次 5 mL , 合并萃取液, 蒸干; 用 $100\text{ }\mu\text{L}$ 甲醇溶解残渣, 得系列青藤碱血浆对照品溶液, 各取 $20\text{ }\mu\text{L}$ 进样测定。以峰面积值为纵坐标, 青藤碱质量浓度为横坐标进行线性回归, 得回归方程 $Y=0.058\text{ }9\text{ }X+2.365\text{ }4$, $r=0.999\text{ }4$, 表明青藤碱在 $0.3\sim 16.0\text{ }\mu\text{g/mL}$ 线性关系良好。

2.5.2 精密度试验 精密吸取 1 h 的体内供试品溶液, 每次进样 $10\text{ }\mu\text{L}$ 测定; 1 d 内重复测定 6 次, 结果青藤碱日内 RSD 为 6.1% ; 每天各测定 1 次, 共 6 d , 结果青藤碱日间 RSD 为 7.5% 。

2.5.3 重现性试验 精密平行吸取 1 h 时体内样品溶液 5 份, 每份 $10\text{ }\mu\text{L}$, 进样分析, 样品中青藤碱质量浓度的 RSD 为 1.76% 。

2.5.4 回收率试验 精密吸取 1.0 mL 青藤碱质量浓度为 $5.4\text{ }\mu\text{g/mL}$ 的样品 9 份, 分别加入 16 、 8.0 、 $0.3\text{ }\mu\text{g/mL}$ 青藤碱血浆对照品溶液 $10\text{ }\mu\text{L}$, 配制成高、中、低 3 个青藤碱质量浓度的供试品溶液各 3 份,

各进样 10 μL 测定, 9 份样品平均回收率为 96%, RSD 为 4.02%, 结果符合测定要求。

2.6 体外和体内试验不同时间点的青藤碱水平

止痹痛巴布剂体外透皮试验和体内透皮试验不同时间点的青藤碱质量浓度见表 1。

表 1 体内外试验不同时间下青藤碱的累积吸收质量浓度
Table 1 Sinomenine concentration of cumulative absorption
in vivo and in vitro test at different times

时间/h	青藤碱/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$		体内累积吸收质量浓度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$
	体外	体内	
1	1.865 2	0.312 2	0.322 7
2	3.134 1	0.530 2	0.569 0
4	4.809 5	0.590 4	0.704 8
6	6.502 4	0.775 8	0.982 1
8	9.015 7	1.071 9	1.402 3
10	12.436 0	1.249 2	1.735 6
12	13.362 0	1.203 9	1.859 2
16	14.627 0	0.919 8	1.860 6
20	16.076 0	0.716 4	1.880 5
24	17.864 0	0.546 9	1.880 9
28	19.132 0	0.451 8	1.919 9

2.7 体内试验药物累积吸收质量浓度的计算

采用 3P87 程序处理止痹痛巴布剂血药质量浓度数据, 经室模型选择符合一室模型, 因此可利用 W-N 法^[5-6]计算不同时间点青藤碱的累积吸收质量浓度, 结果见表 1。累积吸收质量浓度为给药后任意时间的体内血药质量浓度与在此段时间内消除的质量浓度之和。

2.8 体内外相关性分析

将上述体外试验不同时间点青藤碱的累积透过质量浓度与对应的各个时间点的体内累积吸收质量浓度进行线性回归。以体外累积透过质量浓度为横坐标, 体内累积吸收质量浓度为纵坐标, 得回归方程 $Y=0.097\ 24\ X+0.323\ 91$, $r=0.955\ 1$ (图 1)。对相关系数进行显著性检查, 计算统计量 $t=r\ (n-2)^{1/2}/(1-r^2)^{1/2}=9.965\ 8$, 在显著水平 $\alpha=0.001$, 自由度为 10 的条件下, 查得 $t_{0.001}(10)=4.587$, 因为 $t > t_{0.001}(10)$, 表明止痹痛巴布剂体内外相关性非常显著。

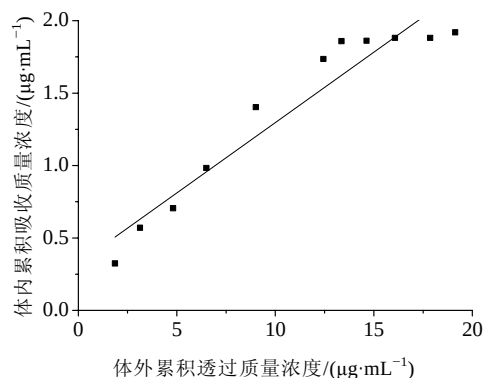


图 1 青藤碱体内累积吸收质量浓度与体外累积透过质量浓度的线性回归

Fig. 1 Linear regression of cumulative absorption concentration in vivo and cumulative delivery concentration in vitro

3 讨论

巴布剂体外透皮试验的开展很大程度上减少了体内透皮研究的难度, 但如果体外透皮试验与体内透皮试验的相关性不好, 那么体外试验数据将丧失意义。因此, 在开发透皮给药系统时, 首先对体内外试验的相关性进行评价是非常必要的。

通过对止痹痛巴布剂体外试验不同时间点青藤碱的累积透过质量浓度与对应的各个时间点的体内累积吸收质量浓度进行相关性分析, 结果表明两者的相关性非常显著 ($\alpha=0.001$)。在这种情况下, 对止痹痛巴布剂进行体外透皮研究, 可以减少体内研究数量, 降低新药开发成本。同时, 本研究方法可为透皮给药系统的体内外相关性评价提供参考。

参考文献

- [1] 郝保华, 王彦玲, 李伟泽, 等. 青风藤电离巴布剂电致孔透皮给药的药动力学研究 [J]. 中草药, 2009, 40(7): 1060-1062.
- [2] 郭伟英, 王 雨. 葛根芩连巴布剂的制备与体外透皮研究 [J]. 医药导报, 2009, 28(3): 351-353.
- [3] 王 军. 双氮芬酸钠巴布剂的制备及体外透皮研究 [J]. 中国药师, 2009, 12(5): 573-575.
- [4] 李 凡, 郝保华, 杜书君, 等. 电致孔条件下巴布剂中青藤碱透皮吸收的药动力学研究 [J]. 第二军医大学学报, 2008, 29(9): 1096-1098.
- [5] 梁文权. 生物药剂学与药物动力学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002.
- [6] 张春华, 周永治. 数理统计方法 [M]. 济南: 山东大学出版社, 1992.