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

徐月红，叶　卉，郭秀彩，刘　霞，韦敏燕，吴传斌
中山大学药学院，广东 广州　510006

摘　要：目的　研究白芥子涂方皮肤给药后皮肤局部药动学特征，为白芥子涂方贴敷预防和治疗哮喘的药物作用机制研究提供参考。**方法**　大鼠在体贴敷白芥子涂方后，以方中君药白芥子的有效成分芥子碱硫氰酸盐为指标，利用微透析采样技术，结合反相高效液相色谱分析，测定白芥子涂方贴敷给药后透析液的药物质量浓度，通过相对损失率的校正，计算皮肤药物质量浓度，并利用 Kinetica 4.4 软件对皮肤药物质量浓度和时间进行非房室模型拟合，计算相关统计矩参数。以相对累积吸收量对时间做图，计算稳态的吸收速率。**结果**　白芥子涂方贴敷给药后芥子碱硫氰酸盐达峰时间为 1.5 h，平均滞留时间（MRT）约为 22 h，半衰期（$t_{1/2}$）约 15 h，稳态吸收速率为 13.65 μg/h。**结论**　微透析取样技术结合反相高效液相色谱分析可研究白芥子涂方给药后的皮肤药动学，给药后的皮肤药动学行为与其临床作用特点相一致，可为阐明白芥子涂方贴敷预防和治疗哮喘的药物作用机制提供研究手段。

关键词：白芥子涂方；微透析；反相高效液相色谱；药动学；透皮特性
中图分类号：R285.61　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**0253 - 2670(2012)02 - 0336 - 05

Dermal pharmacokinetic study of Baijiezi Tufang by microdialysis combined with RP-HPLC

XU Yue-hong, YE Hui, GUO Xiu-cai, LIU Xia, WEI Min-yan, WU Chuan-bin
School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006, China

Abstract: Objective　Dermal pharmacokinetics of Baijiezi Tufang was studied to provide the reference for explaining the drug mechanism of its asthma prevention and cure. **Methods**　Baijiezi Tufang was applied percutaneously to rats *in vivo*. Sinapine thiocyanate was used as index and the samples were extracted by microdialysis and detected by reverse phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC). The dermal concentration was corrected by relative loss rate, the relationship between concentration and time was analyzed by Kinetica 4.4, and the statistical moment parameters were calculated. The steady absorption rate was calculated too by linear regression of cumulative release to time. **Results**　The time to peak (t_{max}) of sinapine thiocyanate was 1.5 h, which was the maximum skin concentration appeared at 1.5 h after drug administration. The mean residence time (MRT) was about 22 h and the half time ($t_{1/2}$) was about 15 h. The steady absorption rate was 13.65 μg/h. **Conclusion**　Dermal pharmacokinetics of Baijiezi Tufang can be studied by microdialysis combined with RP-HPLC. And the dermal pharmacokinetics is in line with the characteristics of Baijiezi Tufang's prevention and cure for asthma clinically. The combination of microdialysis with RP-HPLC is an appropriate study method.

Key words: Baijiezi Tufang; microdialysis; RP-HPLC; pharmacokinetics; transdermal properties

穴位敷贴疗法预防和治疗哮喘方便、疗效确切，至今在临床上广为应用，并已发展为中医特色门诊，但其药物作用机制有待于探讨。临床上穴位贴敷治疗哮喘所用的方药大都源于清代名医张璐《张氏医通》的白芥子涂方，方药组成为白芥子、延胡索、甘遂、细辛等[1]，白芥子涂方穴位敷贴疗法预防和治疗哮喘可能与其皮肤药动学相关。微透析（microdialysis，MD）是在组织中植入半透膜探针，体外

收稿日期：2011-05-10
基金项目：国家自然科学基金资助项目（81073066）；广东省中医药管理局项目（[2008]29 号）
作者简介：徐月红（1969—），女，副教授，硕士生导师，研究方向为药物皮肤给药系统及体内过程。
Tel: (020)39943119　E-mail: lssxyh@mail.sysu.edu.cn
网络出版时间：2012-01-13　网络出版地址：http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20120113.1027.001.html

微量泵使灌流液流经探针，组织中被测物质沿浓度梯度差扩散进入灌流液，并达到一种动态平衡，通过测定流出液待测物的浓度，研究组织细胞外液中待测物的水平及变化过程[2]。MD 作为一种新兴的用于药动学研究的采样技术，具有在体、实时、微创等特点，将 MD 应用于经皮给药的透皮特性研究中可真实反映局部皮肤药物质量浓度及其代谢，并避免了离体皮肤所遇到的水合、变性及细菌生长等问题。因此，本研究以白芥子涂方中君药白芥子的有效成分芥子碱硫氰酸盐[3]为指标，采用微透析取样技术结合 RP-HPLC 对白芥子涂方在体透皮给药后的皮肤药动学进行研究，为阐明该方药的作用机制提供参考。

1 仪器与材料

Agilent 1100 高效液相色谱仪（美国 Agilent 公司），包括四元泵、自动进样器、在线脱气机、紫外检测器及 ChemStation 工作站；微透析设备与系统（美国 BAS 公司），包括 MD—1020—K 四联控制器（BAS），MD—1001 微量泵（BAS），MDN-0100 1 mL 玻璃注射器（BAS），微透析探针（CMA 30，膜长 10 mm，截留相对分子质量 6 000），连接导管（FEP Tubing，CMA），MD—1201 恒温冷冻收集器（BAS）；92SM—202A 电子天平（Precisa Instruments Ltd.，瑞典）。

芥子碱硫氰酸盐对照品（批号 111702-200501，中国药品生物制品检定所）；白芥子、延胡索购自广州致信中药饮片有限公司，甘遂购自广州市清平药材市场，细辛购自广州中医药大学大药房；4 味药材经中山大学药学院生药室马文哲讲师鉴定。冰乙酸（色谱纯，天津市科密欧化学试剂有限公司）；乙腈（色谱纯，Fisher Scientitie），生理盐水及蒸馏水等均为自制。

SD 大鼠，雄性，体质量（200±20）g，中山大学实验动物中心提供，动物合格证号：SCXK（粤）2009-0011。

2 方法与结果

2.1 白芥子涂方浸膏的制备

参考文献方法[4-6]并结合前期的预试验确定白芥子涂方浸膏提取工艺如下：白芥子、延胡索及甘遂粉碎至适宜粒度，用 10 倍量的 80%乙醇对白芥子、延胡索及甘遂合并提取，提取 3 次，每次 2 h；细辛用水蒸气蒸馏法提取挥发油。在 60 ℃水浴下按处方比例混合提取物和挥发油，即得白芥子涂方浸膏，测得浸膏中芥子碱硫氰酸盐为 103.23 mg/g，备用。

2.2 芥子碱硫氰酸盐 RP-HPLC 分析方法的建立

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 Alltima Phenyl 柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相为乙腈（A）-3%醋酸溶液（B），梯度洗脱：0～3 min，80%～75% A；3～5 min，75%～70% A；5～8 min，70% A；8～9 min，70%～80% A；9～15 min，80% A；体积流量 1.0 mL/min；检测波长 326 nm；柱温为室温；进样量 10 μL。

2.2.2 线性关系考察 精密称取在 105 ℃干燥至恒定质量的芥子碱硫氰酸盐对照品 5.56 mg 置于 100 mL 量瓶中，用生理盐水溶解并稀释至刻度，即得 55.6 μg/mL 芥子碱硫氰酸盐对照品储备液。精密量取上述对照品储备液，用生理盐水依次稀释成 27.8、11.12、5.56、2.78、1.11、0.56、0.22、0.11、0.06 μg/mL 芥子碱硫氰酸盐对照品溶液。取 10 μL 进样，测定峰面积，以峰面积为纵坐标（Y），质量浓度（X）为横坐标进行线性回归，得回归方程为 Y＝33.329 X－0.756 4，r＝0.999 9，表明芥子碱硫氰酸盐在 0.06～55.6 μg/mL 线性关系良好。

2.2.3 精密度试验 精密吸取白芥子涂方浸膏透析液 10 μL，照上述色谱条件测定，重复进样 6 次，测定芥子碱硫氰酸盐色谱峰峰面积，RSD 为 1.40%。

2.2.4 稳定性试验 取精密度试验项下供试品溶液 10 μL，分别于 0、2、4、6、8、12 h 进样，测定其峰面积，RSD 为 1.00%，表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.2.5 专属性试验 取“2.3”项下在体微透析试验空白透析液、芥子碱硫氰酸盐对照品溶液及白芥子涂方浸膏透析液按“2.2.1”项下方法进行液相分析，色谱图见图 1。白芥子涂方浸膏透析液中芥子碱硫氰酸盐的保留时间与芥子碱硫氰酸盐对照品溶液基本一致，在体微透析试验空白透析液无干扰，表明所建立的 HPLC 法可专属地用于白芥子涂方的微透析液的测定。

2.2.6 芥子碱硫氰酸盐探针体外回收率的测定 将微透析探针置于盛有 55.6 μg/mL 芥子碱硫氰酸盐对照品溶液的西林瓶中，瓶上覆盖保鲜膜，以生理盐水为灌注液，以 1.5 μL/min 的灌流体积流量进行灌流，开泵运行 1 h 后开始收集透析液，每次收集 30 min 共 45 μL，共收集 3 次，并按“2.2.1”项下色谱条件进行 HPLC 测定，计算体外回收率（$R=C_{透析液}$/

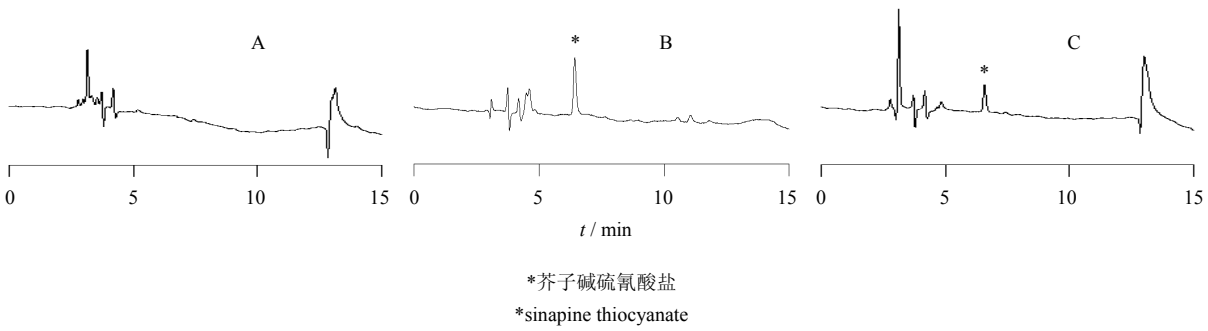

图 1 空白透析液 (A)、芥子碱硫氰酸盐对照品溶液 (B) 和白芥子涂方透析液 (C) 的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of black dialysate (A), sinapine thiocyanate reference substance (B), and Baijiezi Tufang dialysate (C)

$C_{对照品}$），其中 $C_{透析液}$ 为透析液中芥子碱硫氰酸盐的质量浓度，$C_{对照品}$ 为芥子碱硫氰酸盐对照品溶液的质量浓度。然后分别更换为 27.8、11.12 μg/mL 的芥子碱硫氰酸盐对照品溶液作为供试液，照上述操作并测定，计算回收率。高、中、低 3 种质量浓度的体外回收率分别为（50.25±3.6）%、（53.48±2.1）%、（51.07±1.8）%，表明供试品浓度对微透析的回收率影响不大，微透析可用于芥子碱硫氰酸盐的组织液取样。

2.2.7 芥子碱硫氰酸盐探针体内相对损失率的测定 用反透析法对探针的在体相对损失率进行测定。取雄性 SD 大鼠，ip 0.2 g/mL 乌拉坦溶液麻醉，麻醉剂量为 0.5 mL/100 g。固定于鼠板上，将腹部鼠毛剃净，剃毛过程中注意不能将大鼠腹部皮肤碰伤、破坏大鼠角质层。用穿刺针头引导将线性微透析探针平行植入皮下后，将穿刺针抽回而微透析探针膜管留于大鼠皮下组织中，然后将线性探针与微透析装置相连。调节泵的体积流量为 1.5 μL/min，用生理盐水作为灌流液灌流 1.5 h 使探针周围组织恢复正常。然后依次更换质量浓度为 55.6、27.8、11.12 μg/mL 的芥子碱硫氰酸盐对照品溶液为灌流液。更换灌流液后，先开泵运行 1.5 h 再开始收集样品，每次收集 0.5 h，每个浓度收集 3 管。取各样品 10 μL 注入高效液相色谱仪进行分析，根据反透析法测定探针体内相对损失率 $[RL=(C_{灌流液}-C_{透析液})/C_{灌流液}]$[7]，其中 $C_{透析液}$ 为透析液中芥子碱硫氰酸盐的质量浓度，$C_{灌流液}$ 为灌流液中芥子碱硫氰酸盐的质量浓度。计算得各质量浓度下的 RL 分别为（46.67±2.1）%、（42.03±2.5）%、（43.36±1.8）%，表明在改变灌流液质量浓度的情况下，用反透析法测得的探针 RL 差别不大，均在 44%左右，即探针周围芥子碱硫氰酸盐质量浓度对 RL 基本无影响，可用于在体微透析试验的校正。

2.3 白芥子涂方浸膏透皮吸收在体实验

动物处理及探针植入同“2.2.7”项下。探针植入后，以 1.5 μL/min 的灌流体积流量灌流生理盐水平衡 1.5 h，并收集空白透析液，然后于探针透析膜上方的皮肤处置一给药池，在给药池内加入“2.1”项下制得的白芥子涂方浸膏 0.5 g，给药池上方覆盖保鲜膜以防止水分挥发，同时开始收集透析液，每 0.5 h 收集 1 管。取样 10 μL，注入液相色谱仪，测定透析液中的芥子碱硫氰酸盐质量浓度，然后按体内探针 RL 的结果校正，求得皮肤组织中的实际芥子碱硫氰酸盐质量浓度（$C=C_{透析液}$/RL），以皮肤组织中的实际芥子碱硫氰酸盐质量浓度对时间作图，结果见图 2。

对皮肤微透析样品质量浓度对时间采用 Kinetica 4.4 软件拟合，采用非房室分析法-血管外给药途径模块计算统计矩参数，见表 1。同时皮下组织液吸收药物量正比于组织液中药物的质量浓度。

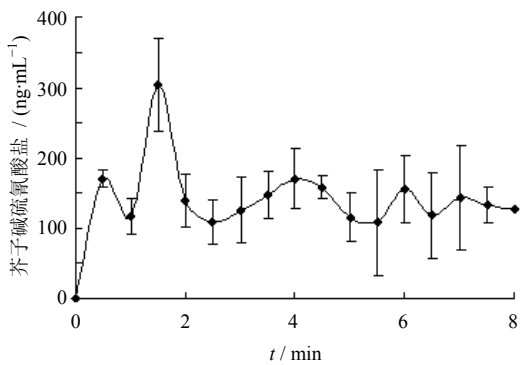

图 2 白芥子涂方浸膏透皮吸收质量浓度-时间曲线图

Fig. 2 Concentration-time profile of Baijiezi Tufang transdermal absorption

表 1 芥子碱硫氰酸盐统计矩模型药动学参数 ($\bar{x}$ ±s, n=3)

Table 1 Pharmacokinetic parameters of sinapine thiocyanate analyzed by statistical moment ($\bar{x}$ ±s, n = 3)

参 数	数 值	参 数	数 值	参 数	数 值
AUC_{last}	1 119.7 h·ng·mL^{-1}	$AUMC_{extra}$	95 864.1 h^2·ng·mL^{-1}	$AUC_{all(CObS)}$	1 119.8 h·ng·mL^{-1}
AUC_{extrat}	2 838.9 h·ng·mL^{-1}	$AUMC_{tot}$	100 255.1 h^2·ng·mL^{-1}	MRT_{last}	3.9 h
AUC_{tot}	3 958.7 h·ng·mL^{-1}	$t_{1/2}$	15.1 h	C_{max}	303.7 ng·mL^{-1}
AUC_{extra}	95864.1·ng·mL^{-1}	MRT	22.4 h	t_{max}	1.5 h
$AUMC_{last}$	4 391.0 h^2·ng·mL^{-1}	$AUC_{all(CPad)}$	119.8 h·ng·mL^{-1}		

由于大鼠给药部位组织液体积不易测得，因此采用取样量（45 μL）求出相对累积吸收量，并绘制累积吸收量对时间曲线图（图 3），得出相关曲线为 Y=13.655 X，r=0.995 8。

统计矩分析表明皮肤药物达峰时间为 1.5 h，平均滞留时间（MRT）约 22 h，半衰期（$t_{1/2}$）约 15 h，说明白芥子涂方给药后芥子碱硫氰酸盐在皮肤中较快就达到峰值，并在较长时间内保持稳定释放，使皮下组织中的药物质量浓度保持在一个相对恒定的水平。这与白芥子涂方临床敷贴给药能较为迅速起效，一次给药能维持较长时间相吻合，提示白芥子涂方给药后的皮肤药动学行为与其临床作用特点有一定的相关性。

由图 3 可见，大鼠皮下组织对芥子碱硫氰酸盐基本呈零级吸收。对其进行线性回归，线性关系良好。直线的斜率为白芥子浸膏透皮给药后其稳态的吸收速率，即每小时吸收 12.98 μg 芥子碱硫氰酸盐。

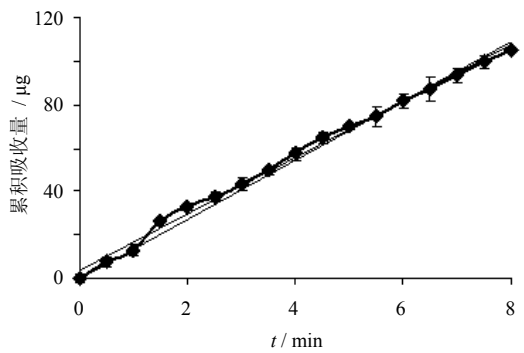

图 3 透析液中芥子碱硫氰酸盐累积吸收量-时间曲线

Fig. 3 Sinapine thiocyanate accumulative amount-time plot in dialysate

3 讨论

白芥子是白芥子涂方中的君药，且芥子碱硫氰酸盐为芥子中抗哮喘的有效成分，因此选择芥子碱硫氰酸盐为指标。在本研究中其皮肤吸收的药物质量浓度可被所建立的液相色谱条件专属准确地分析，表明选择 RP-HPLC 测定白芥子涂方皮肤给药后芥子碱硫氰酸盐是可行的。方中另外一味君药延胡索[8]的有效成分延胡索乙素的皮肤药动学特征正在研究中。

通过微透析探针体外实验，发现灌流液体积流量越低则回收率越高，但相应的取样时间也越长。为了满足液相的进样要求并较真实地反映药物质量浓度的变化情况，确定微透析系统的灌流液体积流量为 1.5 μL/min，取样时间为 30 min。用直接透析法及体内反透析法测定探针回收率和损失率时探针周围的药物质量浓度变化不影响探针的回收率，因此可以采用任意一点的质量浓度进行在体损失率的测定。

通过微透析探针体外回收率和体内 RL 的测定，发现微透析探针体外回收率（51.6%左右）和在体 RL（44%左右）数值相差较大，说明微透析探针透析膜在皮下组织液中的环境与生理盐水相差较大。相同质量浓度的芥子碱硫氰酸盐灌流液流经透析膜时，空白生理盐水要比组织液吸收的更多，这与文献报道的一致[9]。在测定给药后皮下组织中的药物质量浓度时，探针在体 RL 更能反映芥子碱硫氰酸盐的透皮吸收情况，因此采用在体 RL 进行皮肤实际吸收的药物质量浓度的校正。通过敷贴给药后大鼠皮下组织中药物质量浓度的变化曲线图可见，白芥子涂方给药后能迅速透过皮肤，并在较长时间内保持稳定吸收，皮下组织的药物质量浓度恒定。这点为白芥子涂方临床给药每隔 10 d 贴 1 次，即头伏、二伏、三伏各贴 1 次[1]提供了一定的理论依据。白芥子涂方透皮吸收实验结果表明采用微透析技术能够实现在体、实时、微创取样，可以作为白芥子涂方经皮给药透皮吸收的在体评价手段。

白芥子涂方临床是穴位敷贴给药，本研究主要是利用微透析取样技术对其皮肤给药后局部药动学进行初步研究，探讨该技术在白芥子涂方药物作用

机制研究方面应用的可行性，关于穴位与非穴位皮肤给药后局部药动学的比较研究正在进行。

参考文献

[1] 赖新生, 张毅敏. 中药穴位敷贴治疗支气管哮喘的临床研究进展 [J]. 中国药物与临床, 2004, 4(6): 411-414.

[2] 隗慧林, 陈 沄. 微透析与经皮药代动力学 [J]. 国外医学: 皮肤性病学分册, 2005, 31(2): 116-118.

[3] 王 辉, 苑艳霞, 邱 琳, 等. 芥子碱平喘作用及其机制研究 [J]. 中草药, 2011, 42(1): 134-136.

[4] 张 莉, 付 敏, 韩建伟, 等. 复方元胡止痛贴中延胡索、白芷乙醇回流提取工艺研究 [J]. 中国中医药信息杂志, 2008, 15(1): 57-58.

[5] 王晓玲, 许 丽, 胡利华, 等. 正交试验法优选白芥子延胡索甘遂合并提取的工艺 [J]. 解放军药学学报, 2006, 22(3): 187-190.

[6] 厉英光, 田景奎. 正交试验优化细辛挥发油提取及包合工艺的研究 [J]. 中药材, 2006, 29(5): 492-494.

[7] 张英丰, 于 洋, 周莉玲. 微透析技术-同位素示踪法联用进行青藤碱贴剂的皮肤局部药代动力学研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(6): 147-151.

[8] 胡月华, 何扬子. 张氏白芥子涂法在虚寒性疾病中的应用 [J]. 时珍国医国药, 2007, 18(3): 714-715.

[9] 隗慧林, 陈 沄, 徐兰芳, 等. 反向透析法用于体内经皮吸收微透析探针回收率的测定 [J]. 中国新药杂志, 2007, 16(13): 1024-1027.

欢迎订阅《中草药》杂志 1996—2009 年增刊

为了扩大学术交流，提高新药研究水平，经国家新闻出版主管部门批准，我部从1996年起，每年出版增刊一册。

1996年增刊：特邀了国内知名专家就中药新药研究的方向、法规及如何与国际接轨等热点问题撰文阐述。

1997年增刊：包括紫杉醇的化学成分、提取工艺及组织培养等方面的科研论文，并特邀国内从事紫杉醇研究的知名专家撰写综述文章，充分反映了紫杉醇研究方面的新成果、新进展和新动态。

1998年增刊：以当今国际研究的热点银杏叶为专论重点，包括银杏叶的化学成分、提取工艺、质量控制、药理作用及临床应用等方面，充分反映了国内银杏叶开发研究方面的新成果、新进展和新动态。

1999年增刊：为“庆祝《中草药》杂志创刊30周年”会议论文集，特邀中国工程院院士、国家药品监督管理局药品评审中心及知名专家就中药新药研究热点问题撰写了综述文章。

2000年增刊：以“中药新理论、新剂型、新工艺和新技术”为主要内容。

2001年增刊：特邀了中国工程院院士、专家就加快中药现代化的进程，我国入世后中药产业的发展新对策及西部药用植物资源的保护、开发和利用等撰写综述文章。

2002年增刊：以“中药现代化”和“中药指纹图谱”为主要内容。

2003—2008年增刊：包括中药创新药物开发的思路和方法、中药现代化研究、中药知识产权保护、中药专利的申请及中药走向国际等热点内容。

2009年增刊：为庆祝“《中草药》杂志创刊40周年”和“中草药英文版（*Chinese Herbal Medicines*，CHM）创刊”，以中药创新药物开发的思路和方法、活性天然产物的发现及其作用机制研究、中药代谢组学研究、生药学研究、中药的安全性评价和不良反应监控、中药新药审评法规的最新进展、中药知识产权保护和专利的申请、民族药研究为主要内容；学术水平高，内容丰富，信息量大。

以上各卷增刊选题广泛、内容新颖、学术水平高、科学性强，欢迎广大读者订阅。以上增刊为我部自办发行，邮局订阅《中草药》不含增刊，但能提供订阅凭证者，购买增刊7折优惠，款到寄刊。

地址：天津市南开区鞍山西道308号 **邮编：**300193 **网址：**www.tiprpress.com; www.中草药杂志社.中国

电话：(022)27474913 23006821 **传真：**(022)23006821 **E-mail：**zcy@tiprpress.com

《中草药》杂志编辑部