

醒脑静不同制剂给大鼠鼻单向灌流后龙脑和麝香酮吸收比较研究

温 然, 陆 洋, 杨 冰, 李慧云, 赵雪姣, 杜守颖*

北京中医药大学中药学院, 北京 100102

摘 要: 目的 比较醒脑静不同制剂给大鼠鼻单向灌流后其有效成分龙脑和麝香酮吸收特征。方法 采用大鼠在体鼻单向灌流模型, GC 法测定灌流液中龙脑和麝香酮的量, 比较醒脑静滴鼻液与醒脑静微乳中龙脑和麝香酮在大鼠鼻腔的吸收。结果 醒脑静滴鼻液中龙脑吸收速率常数 (K_a) 为 $(1.00 \pm 0.02) \text{ min}^{-1}$, 醒脑静微乳中龙脑 K_a 为 $(0.76 \pm 0.03) \text{ min}^{-1}$; 醒脑静滴鼻液中麝香酮 K_a 为 $(0.76 \pm 0.02) \text{ min}^{-1}$, 醒脑静微乳中麝香酮 K_a 为 $(0.58 \pm 0.10) \text{ min}^{-1}$ 。结论 醒脑静滴鼻液中龙脑和麝香酮在鼻腔的吸收均较醒脑静微乳快。

关键词: 醒脑静滴鼻液; 醒脑静微乳; 龙脑; 麝香酮; 鼻单向灌流; 鼻吸收

中图分类号: R969.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)20-2894-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.20.019

Comparative study on absorption of *Luodian Borneolum* and muscone after nasal unidirectional perfusion with different Xingnaojing preparations in rats

WEN Ran, LU Yang, YANG Bing, LI Hui-yun, ZHAO Xue-jiao, DU Shou-ying

School of Chinese Pharmacy, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China

Abstract: **Objective** To compare the absorption characteristics of *Luodian Borneolum* and muscone after nasal unidirectional perfusion with different Xingnaojing preparations in rats. **Methods** The nasal unidirectional perfusion model was used, the contents of *Luodian Borneolum* and muscone were determined by GC method, and the absorption of *Luodian Borneolum* and muscone in Xingnaojing Nasal Drop (XN) and Xingnaojing Microemulsion (XM) were compared. **Results** The absorption rate constants (K_a) of *Luodian Borneolum* in XN and XM were (1.00 ± 0.02) and $(0.76 \pm 0.03) \text{ min}^{-1}$, respectively, and the K_a values of muscone in XN and XM were (0.76 ± 0.02) and $(0.58 \pm 0.10) \text{ min}^{-1}$, respectively. **Conclusion** The absorption of *Luodian Borneolum* and muscone in XN are both faster than that in XM.

Key words: Xingnaojing Nasal Drop; Xingnaojing Microemulsion; *Luodian Borneolum*; muscone; nasal unidirectional perfusion; nasal absorption

醒脑静滴鼻液由安宫牛黄处方精简而来, 由麝香、冰片、栀子、郁金四味中药组成, 具有清热解毒、凉血活血、开窍醒脑之功效。本课题组将其制成醒脑静微乳鼻用制剂(简称醒脑静微乳), 比较了其与其醒脑静滴鼻液对大鼠鼻黏膜的刺激性, 结果发现醒脑静滴鼻液对大鼠鼻黏膜的刺激性强, 而醒脑静微乳对鼻黏膜的刺激性低且损伤可逆^[1]。

大鼠在体鼻循环灌流法是评价药物经鼻黏膜吸收效果的经典方法, 在鼻腔给药制剂研究中广泛应用, 但采用此法研究醒脑静微乳中有效成分龙脑和麝香酮在大鼠鼻腔吸收时发现, 循环灌流装置对龙

脑和麝香酮有很强的吸附作用, 6 h 内对两者的吸附均达 90% 以上^[2]。因此本实验采用稳定可行的大鼠鼻单向灌流法^[3], 考察醒脑静滴鼻液与醒脑静微乳中龙脑和麝香酮鼻腔吸收的差异, 为醒脑静鼻腔给药制剂的开发提供实验依据。

1 材料

1.1 药品与试剂

龙脑对照品(批号 110881-201107), 质量分数为 99.3%, 麝香酮对照品(批号 0719-200511), 质量分数为 99.6%, 均由中国食品药品检定研究院提供。醒脑静微乳, 实验室自制(通过滴水法绘制伪三元

收稿日期: 2013-01-03

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81073057); 国家自然科学基金青年科学基金资助项目(81102816)

作者简介: 温 然, 女, 硕士研究生。Tel: 15810592251 E-mail: ran09291210@sina.com

*通信作者 杜守颖 Tel: (010)84738615 E-mail: dushouying@263.net

相图制备醒脑静微乳,微乳粒径为 18.71 nm, Zeta 电位为-20.8 mV),含龙脑 40 mg/mL,含麝香酮 5.5 mg/mL;醒脑静滴鼻液,实验室自制,龙脑、麝香酮的量同醒脑静微乳;十八烷,分析纯,德国 Alfa Aesar 公司;娃哈哈纯净水;其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器

YB—P6 型智能透皮试验仪,天津药典标准仪器厂;Sartorius BS 110S 型电子分析天平,北京赛多利斯科学仪器有限公司;DB—300 电子蠕动泵,上海之信仪器有限公司;天美 7980 气相色谱仪,上海天美科学仪器有限公司。

1.3 动物

SD 大鼠,雄性,体质量(250±50)g,北京维通利华试验动物技术有限公司,许可证号 SCXK(京)2006-0009。

2 方法与结果

2.1 龙脑和麝香酮测定

2.1.1 色谱条件 美国惠普 DB-WAX 毛细管色谱柱(30.0 m×0.53 mm, 1.0 μm);载气氮气,体积流量 6 mL/min;进样口温度 250 °C;检测器温度 280 °C;柱温 100 °C 保持 5 min, 30 °C/min 升温至 200 °C,维持 5.5 min;进样量 1 μL,分流比 4:1。在该条件下,系统适应性良好,接收液中的其他物

质对龙脑和麝香酮测定无干扰。结果见图 1。

2.1.2 线性关系考察 精密称取龙脑对照品 53.13 mg 及麝香酮对照品 7.72 mg,至 10 mL 量瓶中,加入 253.66 μg/mL 的十八烷醋酸乙酯内标液稀释至刻度,制成对照品储备液。精密吸取对照品储备液 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.2、2.0 mL 至 2 mL 量瓶中,加内标液稀释至刻度,摇匀。精密吸取空白鼻腔分泌液 100 μL,加入 50 μL 混合对照品溶液、内标液 150 μL,配制成龙脑质量浓度分别为 66.41、132.83、265.65、531.30、796.95、1 062.60、1 328.25 μg/mL 和麝香酮质量浓度分别为 9.65、19.30、38.60、77.20、115.80、154.40、193.00 μg/mL 的对照品溶液,涡旋 2 min,10 000 r/min 离心 10 min,吸取上清液,按“2.1.1”项下色谱条件测定龙脑、十八烷及麝香酮的峰面积积分值。以龙脑与十八烷峰面积比值对质量浓度进行回归,计算龙脑回归方程。结果表明,龙脑质量浓度与峰面积比值在 66.41~1 328.25 μg/mL 时线性关系良好,回归方程 $Y=0.0040X-0.1704$, $r=0.9991$ 。以麝香酮与十八烷峰面积比值对质量浓度进行回归,计算麝香酮回归方程。结果表明,麝香酮质量浓度与峰面积比值在 9.65~193.00 μg/mL 线性关系良好,回归方程为 $Y=0.0035X-0.0091$, $r=0.9991$ 。

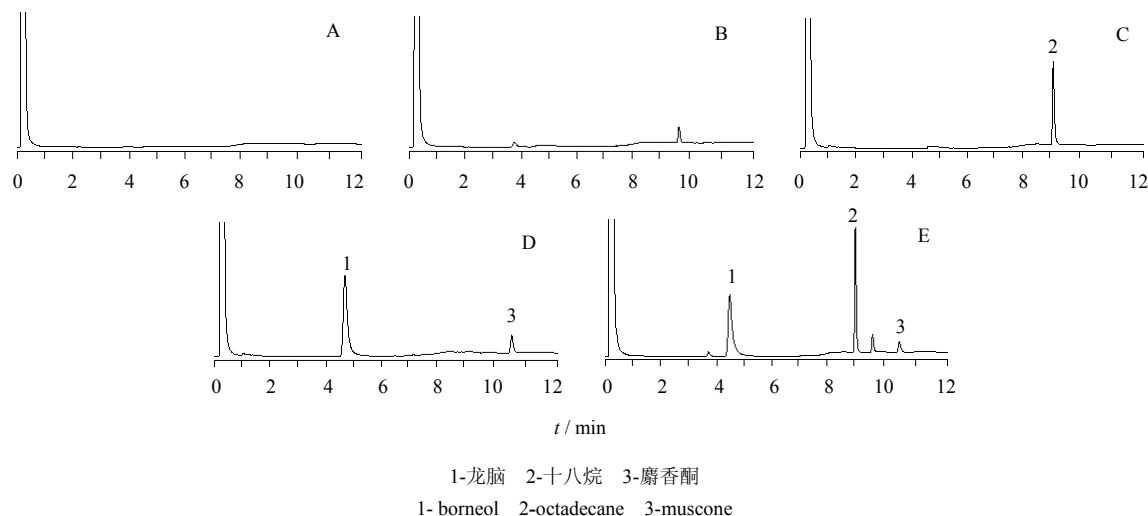


图1 空白鼻腔分泌液(A)、空白醒脑静微乳(B)、内标溶液(C)、混合对照品溶液(D)和供试品溶液(E)的HPLC图
Fig. 1 HPLC chromatograms of blank nasal secretion (A), blank XM (B), internal standard solution (C), mixed reference solution (D), and test solution (E)

2.1.3 精密度试验 精密吸取龙脑质量浓度分别为 132.83、531.30、1 062.60 μg/mL、麝香酮质量浓度分别为 19.30、77.20、154.40 μg/mL 的对照品溶液,

各连续进样3次。结果龙脑日内RSD分别为2.64%、1.25%、0.89%,麝香酮RSD分别为1.68%、2.12%、1.11%,表明仪器的精密度良好。

2.1.4 重复性试验 按“2.1.2”项下方法制备龙脑质量浓度分别为 132.83、531.30、1 062.60 $\mu\text{g/mL}$ 、麝香酮质量浓度分别为 19.30、77.20、154.40 $\mu\text{g/mL}$ 对照品溶液各 3 份,分别进样,结果龙脑的 RSD 分别为 1.10%、1.21%、0.08%,麝香酮的 RSD 分别为 2.85%、1.79%、1.32%,符合实验要求。

2.1.5 稳定性试验 以生理盐水为循环液,将蠕动泵进液口接一根聚乙烯管,插入盛有 10 mL 生理盐水的容器中,蠕动泵出液口连接进入大鼠鼻腔的聚乙烯管,开启蠕动泵使生理盐水通过鼻腔,循环 2 h 后,转移并定容至 10 mL,即得大鼠鼻腔分泌液。以鼻腔分泌液将醒脑静微乳稀释 25 倍,并置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中,孵育振荡,分别于 0、2、4、6、8、10、12 h 取样,测定龙脑和麝香酮的量。结果龙脑和麝香酮量的 RSD 分别为 0.17%、0.83%,表明 2 个成分在大鼠鼻腔分泌液中 12 h 内稳定。

2.1.6 回收率试验 精密称取龙脑、麝香酮对照品,加内标液配制成龙脑质量浓度分别为 345.35、2125.20、5 313.00 $\mu\text{g/mL}$,麝香酮质量浓度分别为 38.60、308.80、772.00 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液。精密吸取 100 μL 鼻腔分泌液,加入 50 μL 混合对照品溶液、150 μL 内标液,涡旋 2 min,10 000 r/min 离心 10 min,吸取上清液,每个浓度平行操作 3 份,计算龙脑、麝香酮的回收率。结果龙脑低、中、高质量浓度平均回收率分别为 100.71%、103.06%、101.31%,麝香酮低、中、高质量浓度的平均回收率分别为 100.04%、100.41%、99.53%。

2.2 大鼠在体鼻单向灌流实验

2.2.1 大鼠在体鼻单向灌流实验 大鼠饲养 1~3 天适应环境,期间正常饮水,实验前禁食 12 h。10 只大鼠分为 2 组,每组 5 只,大鼠 ip 10%水合氯醛麻醉,仰卧固定于鼠板上,颈部切口,暴露气管和食管。取聚乙烯管 2 支,一支插入气管,使其呼吸通畅;另一支的一端插入食管,直至鼻腔后部,另一端与自制的装有药液的玻璃容器相连,载药玻璃容器上端与蠕动泵硅胶管相接。用胶粘剂将鼻腔与口腔的鼻腭通道封闭,以一小玻璃漏斗与大鼠鼻部紧密贴合,漏斗下接玻璃小瓶接收药液,鼠板呈 30 $^{\circ}$ 倾斜,保证药液经大鼠鼻腔流出后直接经漏斗进入小瓶中,漏斗与小瓶间用封口膜封闭。启动蠕动泵使药液经鼻腔灌流,灌流液体积流量 0.2 mL/min。分别于灌流后 10、20、30、40、50、60 min 在大鼠鼻腔出口处用一已知质量的小瓶收集灌流液 1 次,再

次称量小瓶的质量。实验结束后,取各时间点的收集液 0.1 mL,置 0.5 mL 离心管中,加 0.2 mL 内标液,涡旋 2 min,10 000 r/min 离心 10 min,分离上清液,吸取 1 μL 注入气相色谱仪。计算相应时间灌流液中的龙脑和麝香酮质量浓度,采用重量法计算药物吸收速率常数 (K_a)。

$$K_a = \left(1 - \frac{C_{\text{out}}}{C_{\text{in}}} \times \frac{V_{\text{out}}}{V_{\text{in}}} \right) \times \frac{V}{V_{\text{nose}}}$$

式中 V_{in} 和 V_{out} 分别为灌入和收集的供试液体积 (mL) (假定供试液质量浓度为 1.0 kg/L,根据测得质量计算体积), v 为灌流速度, C_{in} 、 C_{out} 分别为进口和出口处缓冲液中药物的质量浓度 (g/L), V_{nose} 为大鼠鼻腔的容积 (以容纳的药液体积计算)

2.2.2 蠕动泵管路的物理吸附情况考察 采用单向灌流装置,将用生理盐水稀释 25 倍的醒脑静微乳充满载药容器及管路,于体外静置,在 0、0.25、0.5、1、2、4、6 h 取样,测定龙脑和麝香酮的量。结果龙脑和麝香酮量的 RSD 分别为 1.25%、1.95%,可以认为单向灌流管路对龙脑和麝香酮在 6 h 内的物理吸附很小,不影响实验。

2.2.3 醒脑静不同制剂中龙脑和麝香酮在大鼠鼻黏膜吸收的比较 将含龙脑 40 mg/mL、麝香酮 5.5 mg/mL 的醒脑静滴鼻液用含 1%聚山梨酯的生理盐水,含龙脑 40 mg/mL、麝香酮 5.5 mg/mL 的醒脑静微乳用生理盐水稀释 25 倍,按“2.2.1”项下方法进行大鼠鼻单向灌流实验。经 SPSS 16.0 统计软件进行 t 检验,醒脑静滴鼻液与醒脑静微乳中龙脑与麝香酮的 K_a 有显著差异 ($P < 0.05$)。结果见表 1 和图 2。

3 讨论

在前期研究的^[4-5]基础上,本实验采用大鼠鼻单向灌流实验比较了醒脑静滴鼻液与醒脑静微乳中龙脑和麝香酮在鼻腔吸收特性,结果表明醒脑静滴鼻液中龙脑和麝香酮的鼻腔吸收均比醒脑静微乳快,其原因可能是由于醒脑静滴鼻液刺激性强,在一定

表 1 醒脑静制剂在体鼻单向灌流龙脑和麝香在大鼠鼻黏膜吸收的 K_a 值 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组 别	K_a / min^{-1}	
	龙脑	麝香酮
醒脑静滴鼻液	1.00 $\pm$ 0.02	0.76 $\pm$ 0.03
醒脑静微乳	0.76 $\pm$ 0.03	0.58 $\pm$ 0.10

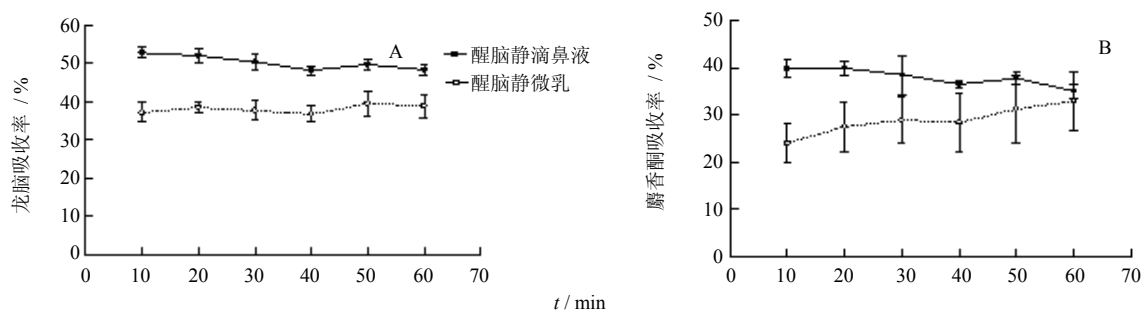


图2 醒脑静不同制剂中龙脑 (A) 和麝香酮 (B) 在大鼠鼻黏膜中的吸收 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Fig. 2 Rat nasal absorption of *Luodian Borneolum* (A) and muscone (B) in Xingnaojing preparations ($\bar{x} \pm s, n=5$)

程度上损伤了大鼠的鼻黏膜,从而加快了药物的吸收。与龙脑单味药相比,醒脑静制剂中龙脑的吸收速率更大,且龙脑还能促进处方中其他药物的鼻腔吸收^[4-5],这些均说明复方制剂的吸收优势。虽然醒脑静微乳中龙脑和麝香酮鼻腔吸收较醒脑静滴鼻液慢,但其鼻黏膜刺激性比滴鼻液小的多,因此醒脑静微乳具有一定的临床意义。

参考文献

- [1] 赵雪姣, 陆洋, 杜守颖, 等. 醒脑静微乳对大鼠鼻黏膜刺激性研究 [J]. 北京中医药大学学报, 2012, 35(9): 626-629.
- [2] 晏亦林, 周莉玲, 叶勇, 等. 磷酸川芎嗪脂质体大鼠在体鼻黏膜吸收研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2007, 18(5): 406-408.
- [3] Chen X L, Lu Y, Du S Y, *et al.* *In situ* and *in vivo* study of nasal absorption of paeonol in rats [J]. *Int J Mol Sci*, 2010, 11(12): 4882-4890.
- [4] 宋道, 杜守颖, 陆洋, 等. 基于单向灌流法的艾片大鼠在体鼻黏膜吸收研究 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(18): 2489-4292.
- [5] 杜守颖, 陆洋, 姚宗玲, 等. 醒脑静中各成分对栀子提取物中栀子苷大鼠鼻腔吸收的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(4): 146-150.