

## 基于微透析技术的丹参酮 II<sub>A</sub> 微针皮肤局部药动学研究

林宇建<sup>1</sup>, 赖建辉<sup>2</sup>, 韩兵<sup>3</sup>, 时军<sup>1,4\*</sup>, 麦钰仪<sup>1</sup>

1. 广东药科大学中药学院, 广东 广州 510006
2. 云浮市中医药局, 广东 云浮 527300
3. 中国医学科学院整形外科医院 整形九科, 北京 100144
4. 广东省局部精准递药制剂工程技术研究中心, 广东 广州 510006

**摘要:** 目的 建立丹参酮 II<sub>A</sub> (tanshinone II<sub>A</sub>, TSA) 微透析取样方法, 探究 TSA 微针皮肤药动学特征。方法 建立 TSA 分析方法, 确定内标物吉非罗齐 (gemfibrozil, GEM) 分析方法的可行性。采用增量法和减量法, 考察 TSA 回收率、GEM 释放率以及 *P* 值稳定性, 建立体外微透析取样系统。兔耳经皮给予丹参酮 II<sub>A</sub> 微针, GEM 作为微透析采样的内标物, 测定 TSA 皮肤药物浓度, 采用 DSA 2.0 软件对药动学数据进行处理, 绘制药物浓度-时间曲线。结果 药物回收率与灌流体流量呈反比, 与温度呈正比, 不受探针外液浓度的影响, *P* 值可保持良好稳定性。GEM 对 TSA 无干扰, *P* 值在体校正后均值为 (60.04 ± 1.90) %。在 TSA 微针的药动学参数和药时曲线中, TSA 微针组的药物浓度明显高于 TSA 药液组, 且曲线平缓, 药物平均滞留时间 (MRT<sub>0→12</sub>) 为 (5.1 ± 1.3) h。结论 TSA 微针给药后, 皮肤组织中浓度较为稳定, 有明显的缓释效果。

**关键词:** 丹参酮 II<sub>A</sub>; 可溶性微针; 微透析; 皮肤; 药动学

中图分类号: R285.61 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)01-0126-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.01.016

## Research of transdermal pharmacokinetics of tanshinone II<sub>A</sub> microneedles based on microdialysis technique

LIN Yu-jian<sup>1</sup>, LAI Jian-hui<sup>2</sup>, HAN Bing<sup>3</sup>, SHI Jun<sup>1,4</sup>, MAI Yu-yi<sup>1</sup>

1. College of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China
2. Traditional Chinese Medicine Bureau of Yunfu, Yunfu 527300, China
3. The Ninth Department of Plastic Surgery, Plastic Surgery Hospital of Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100144, China
4. Guangdong Local Precision Drug Delivery Engineering and Technology Research Center, Guangzhou 510006, China

**Abstract: Objective** To establish the tanshinone II<sub>A</sub> (TSA) microdialysis sampling method and explore the skin pharmacokinetic characteristics of TSA microneedles. **Methods** A TSA analysis method was established to determine the feasibility of internal standard gemfibrozil (GEM) analysis method. The incremental method and decrement method were used to investigate TSA recovery rate, GEM release rate and stability of *P* value, and an *in vitro* microdialysis sampling system was established. TSA microneedle was administered transdermally to rabbit ears, GEM was used as internal standard for microdialysis sampling to determine the TSA skin drug concentration. DSA 2.0 software was used to process the pharmacokinetic data and draw the drug concentration-time curve. **Results** The recovery rate of drug was inversely proportional to perfusion speed, and was positively proportional to temperature without being affected by the concentration of outer liquid of probe, and *P* value could maintain a good stability. GEM had no interference to TSA, and the average *P* value after body correction was (60.04 ± 1.90) %. In pharmacokinetic parameters and drug-time curve of TSA microneedle, the drug concentration of TSA microneedle group was significantly higher than that of TSA liquid group, and the curve was flat. The average drug retention time (MRT<sub>0→12</sub>) was (5.1 ± 1.3) h. **Conclusion** After TSA microneedles is administered, the concentration in skin tissue is relatively stable and has obvious sustained-release effect.

收稿日期: 2021-09-18

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82173982); 广东省高等学校优秀青年教师培养计划项目 (YQ2015099)

作者简介: 林宇建 (1996—), 男, 硕士研究生, 研究方向为中药制剂研究与开发。Tel: 13539730978 E-mail: 1049445880@qq.com

\*通信作者: 时军 (1980—), 男, 博士, 副教授, 主要从事中药经皮给药技术研究与增生性瘢痕防治研究。E-mail: shijun8008@163.com

**Key words:** tanshinone II<sub>A</sub>; soluble microneedles; micro dialysis; skin; pharmacokinetics

丹参为活血祛瘀、凉血消痛的常用中药，临床上常用于治疗胸痹心痛、癥瘕积聚、疮疡肿痛等，在抗炎、抗纤维化等方面有显著的药理作用<sup>[1]</sup>。丹参酮 II<sub>A</sub> (tanshinone II<sub>A</sub>, TSA) 是丹参主要的脂溶性有效成分，具有抗急性缺氧、抗心律失常、抗动脉粥样硬化、抗炎、抗纤维化等作用，对肺、肾、皮肤纤维化具有明显的抑制作用<sup>[2-4]</sup>。目前国内外尚未在临床中使用 TSA 制剂防治增生性瘢痕，故研究 TSA 的透皮制剂可为增生性瘢痕的临床用药提供新的思路。

传统外用制剂由于皮肤角质层的屏障作用，通常会阻碍药物的经皮传递<sup>[5]</sup>。而微针能够突破角质层屏障，使药物快速、有效地发挥作用。微针还具有能够递送大分子药物和让药物在靶部位蓄积的特点，方便使用，微创无痛，提高了患者依从性，为传统药物剂型改进提供了全新的解决办法<sup>[6-7]</sup>。将 TSA 制备成微针，可结合 TSA 抗纤维化的作用以及微针良好的释药性能，突破外用涂抹给药的局限性，使药物能直达瘢痕病灶部位，提高生物利用度。本研究利用微透析技术 (micro-dialysis, MD) 考察透皮制剂对 TSA 微针在皮肤的代谢情况及在体药动学研究，估算相应的药动学参数，为 TSA 皮肤给药提供科学依据。

## 1 材料

### 1.1 动物

SPF 级新西兰兔 10 只，雌雄各半，体质量 2.0~2.5 kg，购自广东省医学实验动物中心，动物许可证号 SCXK (粤) 2019-0015。动物饲养于 SPF 级动物房，动物实验经广东药科大学伦理委员会批准 (批准号 gdpulac2020184)。

### 1.2 药品与试剂

对照品 TSA (质量分数 ≥ 98%，批号 Y27M19C37812)、吉非罗齐 (gemfibrozil, GEM, 质量分数为 98%，批号 Y07N7C24310) 购自上海源叶生物科技有限公司; PVP K30 (批号 12162-100G)、PVP K90 购自美国 Fluka 公司; 硫酸软骨素 (chondroitinsulfate, CS, 批号 MB2743) 购自大连美仑生物技术有限公司

### 1.3 仪器

Dionex UltiMate 3000 高效液相色谱仪 (HPLC, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司); TS-2000A 型摇

床 (海门市其林贝尔仪器制造有限公司); MD1001 型灌注器推进泵、MD0100 型灌注器、MD1002 型灌注器架、MD1000 型流速控制器、MD1020 型线性探针 (美国 BAS 公司); SC-04 型低速离心机 (安徽中科中佳科学仪器有限公司); KQ-300DE 型超声波清洗机 (昆山市超声仪器有限公司); BSA124S 型万分之一天平 (北京赛多利斯仪器系统有限公司); TP-6 型透皮扩散仪 (天津市精拓仪器科技有限公司); 聚四氟乙烯微孔阵列模具 (广州莱客模具)。

## 2 方法与结果

### 2.1 TSA 微针的制备<sup>[8]</sup>

**2.1.1 TSA 固体分散体 (TSA-PVP) 的制备** 按 1:8 精密称取 TSA 和 PVP K30，混合后用足量的无水乙醇溶解，旋蒸回收乙醇至黏稠状，取出干燥，粉碎过 120 目筛，得 TSA-PVP，备用。

**2.1.2 基质溶液的配制** 按 1:1 精密称取 PVP K30 和 CS，混合，加入纯水溶解，得到基质溶液，备用。

**2.1.3 TSA 药液的配制** 称取适量 TSA-PVP，溶于基质溶液，即得。

**2.1.4 背衬层溶液的配制** 称取 PVP K90 适量，加 3 倍量水溶解，即得。

**2.1.5 TSA 微针的制备** 将 TSA 药液浇注于模具上，1500 r/min 离心 10 min; 再将模具旋转 180°，1500 r/min 离心 10 min，重复 2 次; 取出模具，去掉多余药液，待干燥后，在模具上加入背衬层溶液，1500 r/min 离心 10 min; 取出模具于避光干燥器中，干燥后即得 TSA 微针。

### 2.2 TSA 和 GEM 的测定

**2.2.1 色谱条件** Cosmosil C<sub>18</sub> 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-0.5%甲酸溶液 (86:14); 体积流量为 0.8 mL/min; 检测波长为 270 nm; 柱温为 30 °C; 进样量为 10 μL。

**2.2.2 对照品溶液的制备** 精密称取 TSA 对照品，以甲醇为溶剂定容，得到质量浓度为 770 μg/mL 的 TSA 储备液; 取 GEM 对照品，以无水乙醇-PEG400-0.9%氯化钠溶液 (2:1:2) 灌流液为溶剂定容，得到质量浓度为 840 μg/mL 的 GEM 储备液。

**2.2.3 混合对照品储备液的制备** 取 TSA 储备液和 GEM 储备液适量，混合，以无水乙醇-PEG400-0.9%氯化钠溶液 (2:1:2) 灌流液定容，得到 TSA、GEM 质量浓度分别为 92.4、336.0 μg/mL 的混合对

照品储备液。

**2.2.4 线性方程的绘制** 取混合对照品储备液及 GEM 储备液,按一定浓度梯度稀释并进行测定,以峰面积 ( $y$ ) 对进样的质量浓度 ( $x$ ) 进行线性回归,分别绘制 TSA 和 GEM 标准曲线,得到 TSA 回归方程为:  $y=1.3089x-0.1001$ ,  $R^2=0.9999$ , 质量浓度为  $0.92\sim 92.40\ \mu\text{g/mL}$  时线性关系良好;得到 GEM 回归方程为:  $y=0.086x-0.0327$ ,  $R^2=0.9999$ , 质量浓度为  $3.36\sim 336.00\ \mu\text{g/mL}$  时线性关系良好。

**2.2.5 精密度试验** 配制 3 份不同质量浓度的混合储备液,同一份样品连续进样 6 次,记录峰面积。经计算,GEM 质量浓度 RSD 分别为 0.21%、0.64%、0.48%; TSA 质量浓度 RSD 分别为 0.89%、0.45%、0.26%,均小于 2%,表明仪器精密度良好。

**2.2.6 稳定性试验** 取混合储备液分别于 2、4、6、8、12、24 h 进样检测,记录峰面积。经计算,GEM 质量浓度 RSD 为 0.75%, TSA 质量浓度 RSD 为 0.57%,均小于 2%,表明 TSA 和 GEM 在 24 h 内稳定。

**2.2.7 专属性试验** 分别取 TSA 储备液、GEM 储备液、混合储备液以及空白溶剂(灌流溶液)适量,经  $0.22\ \mu\text{m}$  微孔滤膜滤过,进样检测。如图 1 所示,GEM 和 TSA 峰形良好,无干扰峰,表明方法可行且专属性强。

**2.2.8 重复性试验** 取同批样品 6 份,进样检测,记录峰面积,TSA、GEM 的 RSD 分别为 1.27%、1.36%,

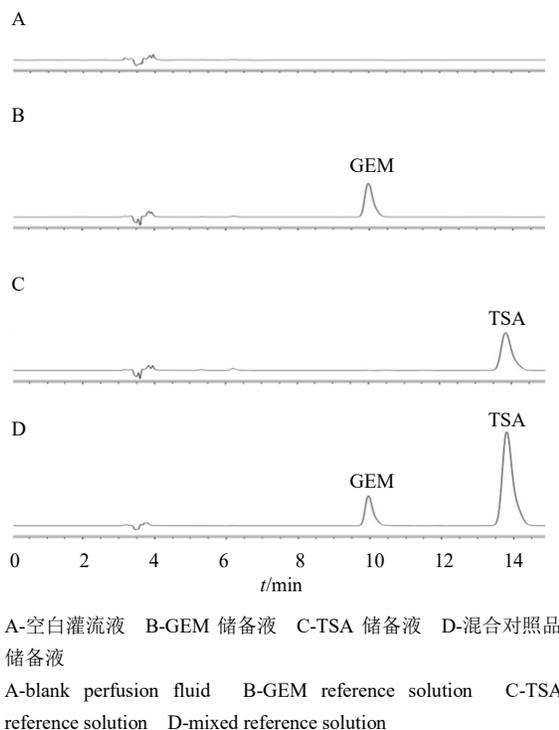


图 1 TSA 和 GEM 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC digram of TSA and GEM

均小于 2%,表明该方法的重复性良好。

**2.3 微透析灌流液的筛选<sup>[9]</sup>**

取过量的 TSA 分别加入适量不同灌流液<sup>[10]</sup>,测定 TSA 和 GEM 在不同溶液中的溶解度。结果见表 1, TSA 在 S1 中溶解度极低,无法检测,而在 S5 溶液中溶解度最大。

表 1 TSA 和 GEM 在不同灌流液介质中的溶解度

Table 1 Solubility of TSA and GEM in different perfusion solution

灌流液编号	无水乙醇-PEG400-0.9%氯化钠溶液比例	TSA 溶解度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	GEM 溶解度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$
S1	1 : 2 : 7	—	187.321
S2	1 : 1 : 3	2.179	917.608
S3	3 : 2 : 5	40.397	3 508.430
S4	2 : 1 : 2	96.666	7 153.965
S5	5 : 2 : 3	169.476	7 806.724

根据溶解度实验结果,采用增量法考察 S3、S4 和 S5 这 3 种灌流溶液中的药物回收率,确定合适的微透析灌流液。按“2.2.1”项色谱条件测定样品,按公式(1)计算 TSA 回收率 ( $R_{R,T}$ ),按公式(2)计算 GEM 回收率 ( $R_{R,G}$ )。

$$R_{R,T} = C_{d,T} / C_{cef,T} \quad (1)$$

$$R_{R,G} = C_{d,G} / C_{cef,G} \quad (2)$$

$C_{d,T}$ 、 $C_{d,G}$  分别为透析液中 TSA 和 GEM 的质量浓度;  $C_{cef,T}$ 、 $C_{cef,G}$  分别为探针外液中 TSA 和 GEM 的质量浓度

如表 2 所示,以 S5 作为灌流液时, TSA 的回收率最高;而在 3 种灌流液中, GEM 的回收率无明

显区别。

**2.4 回收率、释放率及 P 值影响因素考察**

**2.4.1 灌流体积流量对回收率、释放率及 P 值的影响** 将微透析探针半透膜完全浸泡于含 TSA 的 S4 溶液中,灌流液为含 GEM ( $8.383\ \mu\text{g/mL}$ ) 的 S4 溶液,控制透皮扩散仪温度  $37\ ^\circ\text{C}$ ,转速为  $350\ \text{r/min}$ ;分别以  $0.5$ 、 $0.8$ 、 $1.5\ \mu\text{L/min}$  体积流量灌流,平衡  $60\ \text{min}$  后开始收集透析液,每份  $20\ \mu\text{L}$ ,各体积流量收集 5 份。通过 HPLC 测定样品,按公式(1)计算  $R_{R,T}$ ,按公式(3)计算 GEM 释放率 ( $R_{D,G}$ ),按公式(4)计算  $R_{R,T}$  与  $R_{D,G}$  比值 ( $P$ )。

表2 TSA和GEM在不同灌流液中的回收率

Table 2 Recoveries of TSA and GEM in different perfusates

灌流液	GEM 回收率/%	TSA 回收率/%
S3	25.45±0.29	31.63±0.60
S4	25.64±0.29	40.76±0.68
S5	27.78±0.35	41.20±0.76

$$R_{D,G}=(C_{p,G}-C_{d,G})/C_{p,G} \quad (3)$$

$$P=R_{D,G}/R_{R,T} \quad (4)$$

$C_{d,G}$ 为透析液中GEM的质量浓度,  $C_{p,G}$ 为灌流液中GEM的质量浓度,  $R_{R,T}$ 为TSA回收率,  $R_{D,G}$ 为GEM释放率

如表3所示,  $R_{R,T}$ 与 $R_{D,G}$ 随体积流量的增大而降低, 但 $R_{R,T}$ 和 $R_{D,G}$ 两者变化幅度基本一致, 在不

表3 灌流体积流量对回收率、释放率及P值的影响

Table 3 Effects of different perfusion rates on recovery rate, delivery rate and P value

灌流体积流量/( $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ )	$C_{\text{cef,T}}/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	$\bar{R}_{D,G}$	$\bar{R}_{R,T}$	$\bar{P}/\%$	RSD/%
0.5	5.875	37.00	72.45	50.65±0.56	1.11
0.8	5.815	25.96	51.42		
1.5	5.853	19.24	38.16		

同体积流量下, P值为(50.65±0.56)%, 表明P值稳定, 不受灌流体积流量影响。

2.4.2 温度对回收率、释放率及P值的影响 将微透析探针半透膜完全浸泡于含TSA的S4溶液中, 灌流液为含GEM(8.383  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )的S4溶液, 转速为350 r/min; 灌流体积流量为0.8  $\mu\text{L}/\text{min}$ , 分别于

25、32、37  $^{\circ}\text{C}$ 收集3组透析液, 平衡60 min后开始收集透析液, 每份20  $\mu\text{L}$ , 各体积流量收集5份。通过HPLC进样测定, 计算 $R_{R,T}$ 、 $R_{D,G}$ 和P值。

如表4所示,  $R_{R,T}$ 与 $R_{D,G}$ 随微透析环境温度的增大而提高, 在25~37  $^{\circ}\text{C}$ 温度, P值为(50.89±0.56)%, 表明P值稳定, 不受温度影响。

表4 温度对回收率、释放率及P值的影响

Table 4 Effects of different temperatures on recovery rate, delivery rate and P value

T/ $^{\circ}\text{C}$	$C_{\text{cef,T}}/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	$\bar{R}_{D,G}$	$\bar{R}_{R,T}$	$\bar{P}/\%$	RSD/%
25	5.865	18.43	36.24	50.89±0.56	1.85
32	5.854	21.98	42.93		
37	5.815	26.01	51.38		

2.4.3 质量浓度对回收率、释放率及P值的影响 以S4为溶剂, 配制低、中、高3种不同质量浓度(2.740、5.719、28.827  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )的TSA溶液作为探针外液, 灌流液为含GEM(8.109  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )的S4溶液。微透析探针半透膜分别浸泡于3种探针外液中, 控制透皮扩散仪实验温度为(37.0±0.5)  $^{\circ}\text{C}$ , 转速为350 r/min; 灌流体积流量0.8  $\mu\text{L}/\text{min}$ , 平衡60 min后开始收集透析液, 各浓度收集5份样品, 每份20  $\mu\text{L}$ , 计算 $R_{R,T}$ 、 $R_{D,G}$ 和P值。

如表5所示, 药物质量浓度对 $R_{R,T}$ 与 $R_{D,G}$ 无显著影响, P值稳定, P值为(50.52±0.98)%。

表5 质量浓度对回收率、释放率及P值的影响

Table 5 Effects of different concentration on recovery rate, delivery rate and P value

$C_{\text{cef,T}}/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	$\bar{R}_{D,G}$	$\bar{R}_{R,T}$	$\bar{P}/\%$	RSD/%
2.740	25.09	49.52	50.52±0.98	1.95
5.719	25.50	50.25		
28.827	25.88	51.61		

2.4.4 内标物GEM对TSA回收率、释放率的影响以及MD取样稳定性考察

(1)增量法: 将微透析探针半透膜完全浸泡于含TSA的S4溶液中, 控制透皮扩散仪温度为(37.0±0.5)  $^{\circ}\text{C}$ , 转速为350 r/min, 灌流体积流量为0.8  $\mu\text{L}/\text{min}$ 。先用空白S4做灌流液, 平衡60 min后收集透析液5份, 每份20  $\mu\text{L}$ 。收集完后, 将灌流液更换为含GEM的S4溶液, 重新平衡60 min后开始收集, 每份收集量为20  $\mu\text{L}$ , 共收集透析样品30份, 收集时间12 h。通过HPLC进样测定, 计算 $R_{R,T}$ 、 $R_{D,G}$ 和P值。

如图2所示, 用空白灌流液灌流时, TSA平均回收率为(51.06±0.11)%, 更换含GEM的灌流液后,  $R_{R,T}$ 为(50.73±0.27)%, 无显著变化, 表明GEM并不会对TSA回收产生干扰, TSA在12 h回收率稳定;  $R_{D,G}$ 为(26.25±0.46)%, 表明GEM探针释放率稳定; P值为(51.74±0.95)%, 表明P值稳定。

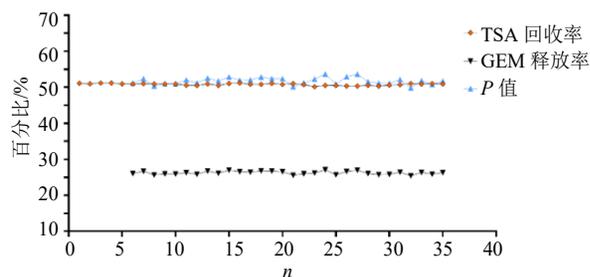


图2 增量法考察 TSA 和 GEM 微透析取样稳定性

Fig. 2 Stability investigation of TSA and GEM during MD sampling by gain method

(2) 减量法: 将微透析探针半透膜完全浸泡于空白 S4 溶液中, 控制透皮扩散仪温度为  $(37.0 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ , 磁力搅拌子转速为 350 r/min, 灌流体流量为  $0.8 \mu\text{L}/\text{min}$ 。先用含 TSA 的 S4 做灌流液, 平衡 60 min 后收集透析液 5 份, 每份  $20 \mu\text{L}$ ; 收集完前 5 份透析液后, 将灌流液更换为含 TSA 和 GEM 的 S4 溶液, 其余同增量法。通过 HPLC 进样测定, 按公式 (5) 计算  $R_{D,T}$ , 按公式 (3) 计算  $R_{D,G}$ , 按公式 (6) 计算  $R_{D,G}$  与  $R_{D,T}$  比值 ( $P$ )。

$$R_{D,T} = (C_{p,T} - C_{d,T}) / C_{p,T} \quad (5)$$

$$P = R_{D,G} / R_{D,T} \quad (6)$$

$C_{p,T}$  为灌流液中 TSA 的质量浓度,  $C_{d,T}$  为透析液中 TSA 的质量浓度,  $R_{D,T}$  为 TSA 释放率,  $R_{D,G}$  为 GEM 释放率

如图 3 所示, 用 TSA 灌流液时,  $R_{D,T}$  为  $(48.84 \pm 0.46)\%$ , 更换含 TSA 和 GEM 的混合灌流液后,  $R_{D,T}$  为  $(48.08 \pm 0.62)\%$ , 无显著变化, 表明 GEM 并不会对 TSA 释放产生干扰, TSA 在 12 h 释放率稳定;  $R_{D,G}$  为  $(25.26 \pm 0.45)\%$ , 表明 GEM 探针释放率稳定;  $P$  值为  $(52.55 \pm 0.99)\%$ , 表明  $P$  值稳定。

## 2.5 在体 TSA 和 GEM 的测定

**2.5.1 色谱条件** Cosmosil  $C_{18}$  色谱柱 ( $250 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}$ ,  $5 \mu\text{m}$ ); 流动相为乙腈 (A) -0.5% 甲酸水溶

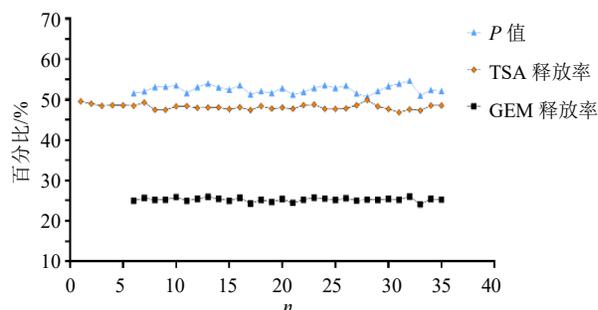


图3 减量法考察 TSA 和 GEM 微透析取样稳定性

Fig. 3 Stability investigation of TSA and GEM during MD sampling by loss method

液 (B), 梯度洗脱:  $0 \sim 3 \text{ min}$ , 30% B;  $3 \sim 13 \text{ min}$ , 20% B; 体积流量为  $0.8 \text{ mL}/\text{min}$ ; 检测波长为 270 nm; 柱温为  $30^\circ\text{C}$ ; 进样量为  $10 \mu\text{L}$ 。

**2.5.2 专属性试验** 将 TSA 储备液、GEM 储备液、混合储备液以及空白溶剂 (S4 溶液) 进行检测, 结果显示, GEM 和 TSA 峰形良好, 无杂峰干扰, 分离度和对称因子均符合要求。

**2.5.3 线性关系考察** 分别取 TSA 储备液和 GEM 储备液, 按一定浓度梯度用 S4 稀释, 以峰面积 ( $y$ ) 对进样的浓度 ( $x$ ) 进行线性回归, 绘制标准曲线。TSA 回归方程为:  $y = 1.0045x - 0.0079$ ,  $R^2 = 0.9996$ , 表明质量浓度为  $18.12 \sim 362.40 \text{ ng}/\text{mL}$  时线性关系良好; GEM 回归方程为:  $y = 0.0647x - 0.0085$ ,  $R^2 = 0.9999$ , 表明质量浓度为  $1.768 \sim 17.680 \mu\text{g}/\text{mL}$  时线性关系良好。

**2.5.4 精密度试验** 取 TSA 储备液和 GEM 储备液, 配制低、中、高 3 个质量浓度混合对照品溶液, 同一份样品连续进样 6 次, 得到 GEM 质量浓度 RSD 分别为 1.18%、0.69%、1.36%; TSA 质量浓度 RSD 分别为 0.37%、0.53%、0.35%, 均小于 2%, 表明仪器精密度良好, 检测方法精密度良好。

**2.5.5 稳定性试验** 取上述混合对照品溶液分别于 2、4、6、8、12、24 h 进样检测, 记录峰面积。得到 GEM、TSA 的 RSD 分别为 0.69%、0.38%, 均小于 2%, 表明 TSA 和 GEM 在 24 h 内稳定。

**2.5.6 重复性试验** 取同批样品 6 份, 进样检测, 记录峰面积, TSA、GEM 的 RSD 分别为 1.14%、1.25%, 均小于 2%, 表明该方法的重复性良好。

## 2.6 $P$ 值的在体校正

将线性探针植入兔子耳腹, 以  $0.8 \mu\text{L}/\text{min}$  体积流量灌流 0.9% 氯化钠溶液 1 h, 使植入部位皮肤组织损伤消退, 机能恢复。然后更换 S4 溶液灌流 1 h, 收集 1 份空白透析液。更换含 TSA 和 GEM 的混合 S4 溶液灌流, 平衡 1 h 后收集样品, 每 20 分钟收集 1 份, 共收集 12 h。另取 2 组实验白兔, 重复上述操作。

通过 HPLC 测定  $C_{d,T}$ 、 $C_{d,G}$ 、 $C_{p,G}$ 、 $C_{p,T}$ 。计算  $R_{D,T}$ 、 $R_{D,G}$  和  $P$  值。如图 4 所示,  $P$  值为  $(60.04 \pm 1.90)\%$ , RSD 为 3.16%, 符合生物样品分析误差范围,  $P$  值稳定性良好。

## 2.7 给药及微透析取样

**2.7.1 药液组药动力学考察** 配制 TSA 药液 ( $632.44 \mu\text{g}/\text{g}$ ), 其中包含 2% 丙酮和 10% 丙二醇作为促渗剂。

植入线性探针后,以 0.8 μL/min 体积流量灌流 0.9% 氯化钠溶液 1h,使植入部位皮肤组织机能恢复。然后更换 GEM 的 S4 溶液灌流,平衡 1h 后,在正对

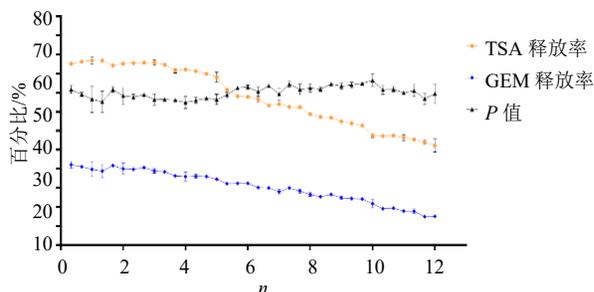


图4 TSA 和 GEM 在体微透析取样情况 (n = 3)  
Fig. 4 MD sampling of TSA and GEM in vivo (n = 3)

着微透析探针透析膜的皮肤上粘上 1 个给药池,在池内涂抹药物(约 1g)。随后开始收集样品,记为 0 时。此后每 20 分钟收集 1 份样品,共收集 12 h。通过 HPLC 测定透析样品、灌流液中药物质量浓度 (C<sub>d,T</sub>、C<sub>d,G</sub>、C<sub>p,G</sub>),实验平行 3 次。

2.7.2 微针组药动学考察 实验兔子除去耳腹毛发并麻醉,取 TSA 微针[载药量为 (619.40 ± 12.38) μg/片]按压兔耳耳腹处给药,垂直于皮肤按压,按压时间 15 min 后取下微针。然后立刻使用 18 G 穿刺针在给药处皮下穿刺,引导线性微透析探针平行植入,后抽回引导针,使探针半透膜管部位留在微针给药组织皮下。其余操作均与“2.7.1”项下方法一致,实验平行 3 次,取样流程见图 5。

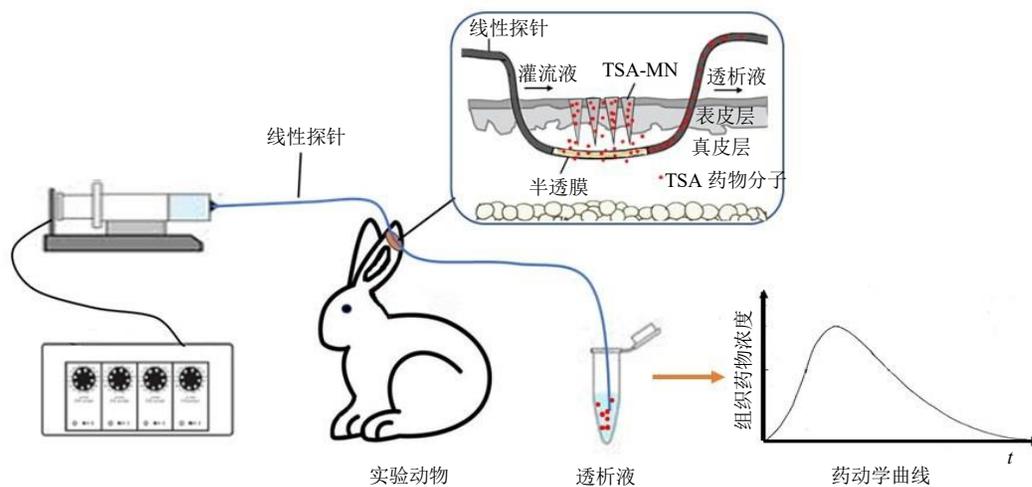


图5 微透析取样示意图  
Fig. 5 Experiment diagram of microdialysis sampling

### 2.8 药动学数据处理

按公式(3)计算每个取样点 R<sub>D,G</sub>,基于在体 P 值的校正结果为 60.04%,结合公式(1)、(4)计算组织中理论 TSA 游离药物质量浓度 (C<sub>TSA</sub>)。采用 DSA2.0 软件进行数据处理,使用非房室模型对皮肤组织中 C<sub>TSA</sub> 与时间 (t) 数据进行拟合。主要药动学参数见表 6,药物浓度-时间曲线见图 6。给药后,

TSA 微针组组织药物浓度明显高于 TSA 药液组;与 TSA 药液组相比,微针组的药时浓度曲线相对平缓,表明 TSA 微针释药速率平稳;微针组平均滞留时间 (MRT) 明显比药液组延长,给药 12 h 仍能在组织中检测到游离药物,表明 TSA 微针药物能在皮肤中有一定浓度蓄积,形成储库效应,可持续作用于病灶部位真皮层发挥药效。

表 6 药动学参数

Table 6 Pharmacokinetic parameters

参数	单位	TSA 药液组	TSA 微针组
T <sub>max</sub>	h	1.556 ± 0.193	2.111 ± 0.962
C <sub>max</sub>	ng·mL <sup>-1</sup>	85.533 ± 11.541	112.776 ± 15.822
MRT <sub>0→12</sub>	h	3.285 ± 0.090	4.854 ± 0.048
MRT <sub>0→∞</sub>	h	5.198 ± 0.361	7.527 ± 0.494
AUC <sub>0→12</sub>	ng·mL <sup>-1</sup> ·h	347.399 ± 37.005	842.377 ± 44.045
AUC <sub>0→∞</sub>	ng·mL <sup>-1</sup> ·h	425.562 ± 44.009	1 043.856 ± 44.966
V <sub>d</sub>	mL <sup>-1</sup> ·h	0.758 ± 0.027	0.114 ± 0.021
CL	mL <sup>-1</sup> ·h	0.027 ± 0	0.016 ± 0

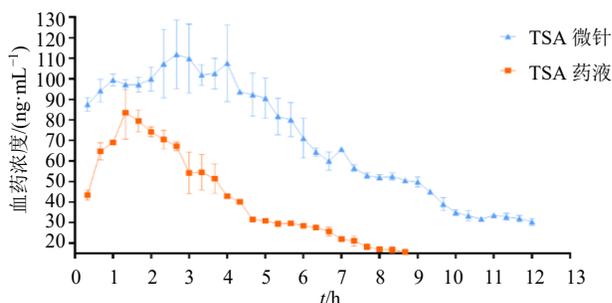


图6 TSA 药物浓度-时间曲线

Fig. 6 Drug concentration-time curve of TSA

### 3 讨论

施用于皮肤的药物在血液中的浓度往往很低，血药浓度并不能准确反映皮肤组织中真实的药物代谢特征<sup>[11-12]</sup>。经皮微透析直接对靶部位皮肤组织液进行采样分析，得到的药动学参数可更真实地反映药物透皮性能及其在皮肤的代谢情况，而且微透析取样能更好地维持实验动物生理功能，具有实时、连续、方便检测等优势<sup>[13]</sup>。

研究发现，微透析对 TSA 这类脂溶性药物取样以及后续检测的难度较大，与其水溶性差、蛋白结合率高等理化性质有关<sup>[14]</sup>。目前改善脂溶性药物回收的方法主要是优化灌流介质，使得更多脂溶性物质溶解并进入探针，以提高回收率<sup>[15]</sup>。在进行微透析取样前需要对 TSA 微透析灌流液进行优化筛选，选择出溶解度较优的灌流液组分，以便于后续实验开展。结果表明，无水乙醇、PEG400 和 0.9%氯化钠溶液三者的混合溶液对 TSA 和 GEM 的溶解性能良好，并随着无水乙醇的含量越多溶解性越好。但考虑到无水乙醇可能会对皮肤组织产生刺激，在保证药物回收率的前提下，理应减少无水乙醇的用量，所以最终选择无水乙醇-PEG400-0.9%氯化钠溶液(2:1:2)作为灌流液，用于进一步实验。

实验结果表明，探针回收率(释放率)与灌流体积流量呈反比，但对微透析样品进行分析时，必须要满足分析方法所需要的样品量，体积流量越低，取样间隔越长，便会带来时滞，无法实时、准确反映药动变化规律；在相同取样间隔内，虽然较高体积流量能提供更多样品体积，但同时药物的浓度也会降低，对分析方法的灵敏度要求更高。结合多方面因素的考虑，最终选择灌流体积流量为 0.8  $\mu\text{L}/\text{min}$ ，取样间隔 20 min。

采用增量法和减量法分别考察体外实验中内标物与药物的回收率、释放率，共同验证了药物回收

率和释放率的一致性，表明了内标物的稳定性，为体内回收率的计算提供了有力的基础。内标物释放率与待测药物回收率比值  $P$  在体内、体外实验中有较大差异，体外实验无法绝对模拟体内过程，因此需要对  $P$  值进行体内校正<sup>[16]</sup>。在体内校正时在体内微透析过程中，药物释放率会随着实验时间的延长而呈下降趋势或是出现波动。与反透析法等始终以不变的回收率进行组织游离药物浓度推算的方法相较，内标法的实时动态校正可克服实验动物生理因素及探针自身损耗的影响，更具有准确性和可靠性<sup>[17-18]</sup>。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

### 参考文献

- [1] 丁凡, 王拥军, 张岩. 丹参活性成分的药理作用和临床应用研究进展 [J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(2): 659-662.
- [2] Guo R, Li L, Su J, et al. Pharmacological activity and mechanism of tanshinone II<sub>A</sub> in related diseases [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2020, 14: 4735-4748.
- [3] 许小琪, 韩兵, 赖建辉, 等. 丹参酮 II<sub>A</sub> 对 TGF- $\beta$ <sub>1</sub> 诱导的人皮肤成纤维细胞增殖的影响及作用机制 [J]. 中草药, 2020, 51(18): 4685-4690.
- [4] 宋雨, 王涛. 丹参酮 II<sub>A</sub> 磺酸钠注射液联合胺碘酮治疗室性早搏的疗效观察 [J]. 药物评价研究, 2021, 44(4): 809-813.
- [5] Lee H, Song C, Baik S, et al. Device-assisted transdermal drug delivery [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2018, 127: 35-45.
- [6] Liu G S, Kong Y, Wang Y, et al. Microneedles for transdermal diagnostics: Recent advances and new horizons [J]. *Biomaterials*, 2020, 232: 119740.
- [7] Ali R, Mehta P, Arshad M S, et al. Transdermal microneedles-A materials perspective [J]. *AAPS PharmSciTech*, 2019, 21(1): 12.
- [8] 郭思旖. 丹参酮 II<sub>A</sub> 自溶性微针的制备及其抑制 HSF 增殖实验研究 [D]. 广州: 广东药科大学, 2020.
- [9] 马树人, 钟天耕, 于筛成, 等. 复合透皮吸收促进剂对丹参酮透皮作用的研究 [J]. 中成药, 2000, 22(11): 749-752.
- [10] 骆校权. 丹参酮 II<sub>A</sub> 透皮吸收在体评价技术研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2007.
- [11] 韦园诗, 朱黎霞, 黄星星, 等. 微透析技术联用 UPLC-Q/TOF-MS 的大脑中动脉栓塞大鼠代谢组学研究 [J]. 中草药, 2019, 50(13): 3155-3161.
- [12] Voelkner N M F, Voelkner A, Costa J, et al. Dermal pharmacokinetics of pyrazinamide determined by microdialysis sampling in rats [J]. *Int J Antimicrob Agents*,

- 2018, 51(2): 190-196.
- [13] Kho C M, Enche Ab Rahim S K, Ahmad Z A, *et al.* A review on microdialysis calibration methods: The theory and current related efforts [J]. *Mol Neurobiol*, 2017, 54(5): 3506-3527.
- [14] Whitaker G, Lunte C E. Investigation of microdialysis sampling calibration approaches for lipophilic analytes: Doxorubicin [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2010, 53(3): 490-496.
- [15] Zhang Y T, Wang Z, Shen L N, *et al.* A novel microemulsion-based isotonic perfusate modulated by Ringer's solution for improved microdialysis recovery of liposoluble substances [J]. *J Nanobiotechnol*, 2018, 16(1): 91.
- [16] 侯远鑫. 微透析技术应用于吉非替尼 (Gefitinib) 药动学研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2014.
- [17] 贺怡, 陈翔, 朱海媚, 等. 基于内标微透析技术同步分析尼古丁透皮贴剂在血液与皮肤的药动学 [J]. *中国医院药学杂志*, 2019, 39(9): 888-892.
- [18] Hershey N D, Kennedy R T. *In vivo* calibration of microdialysis using infusion of stable-isotope labeled neurotransmitters [J]. *ACS Chem Neurosci*, 2013, 4(5): 729-736.

[责任编辑 李亚楠]