

• 论著 •

用在体皮肤微透析法研究黄芩苷凝胶经大鼠皮肤吸收的局部药动学

娄月芬¹,朱全刚^{2,3},尤本明³,李洁³,顾小燕²,张若曦²(1. 上海市第一人民医院分院药剂科,上海 200081; 2. 上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院药理学部,上海 200437; 3. 第二军医大学附属长海医院药理学部,上海 200433)

【摘要】 目的 建立大鼠在体皮肤微透析技术,研究黄芩苷凝胶经皮吸收局部药动学。方法 采用 HPLC-MS/MS 联用技术测定大鼠皮肤微透析液中黄芩苷的浓度。SD 大鼠在麻醉状态下做皮肤微透析预处理,然后将黄芩苷凝胶涂于探针所在皮肤表面,收集皮肤微透析液样品进行黄芩苷浓度测定,绘制黄芩苷浓度-时间曲线,计算经皮吸收局部药动学参数。结果 用于定量分析的离子对为 m/z 447.3→271.2,黄芩苷在检测浓度范围内线性关系良好,色谱的专属性、精密度等测定结果均符合生物样品测定要求。体内皮下探针回收率为(24.40±0.91)%。240 min 内各取样点回收率保持稳定;黄芩苷经皮给药后 8 h 内微透析液中均可检测到黄芩苷的存在,且药物在皮肤组织内浓度持续升高,AUC₀₋₁为(50.04±34.17) (mg·min)/L。**结论** 在体皮肤微透析法可用于黄芩苷经皮吸收局部药动学研究。

【关键词】 黄芩苷凝胶;微透析;经皮吸收局部药动学;大鼠

【中图分类号】 R932 R943.43

【文献标志码】 A

【文章编号】 1006-0111(2014)06-0444-04

【DOI】 10.3969/j.issn.1006-0111.2014.06.011

Study on local pharmacokinetics of baicalin gel after transdermal administration in rats by skin microdialysis *in vivo*

LOU Yuefen¹, ZHU Quangang^{2,3}, YOU Benming³, LI Jie³, GU Xiaoyan², ZHANG Ruoxi²(1. Department of Pharmacy, Branch of Shanghai First People's Hospital, Shanghai 200081, China; 2. Department of Pharmacy, Yueyang Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200437, China; 3. Department of Pharmacy, Changhai Hospital Affiliated to Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

【Abstract】 Objective To develop a novel skin microdialysis technology *in vivo*, and to determine the pharmacokinetic of baicalin after transdermal administration in rats. **Methods** An HPLC-MS/MS method used for the determination of baicalin in skin microdialysis samples was established. SD rats were pretreated with skin microdialysis operation under anesthesia, and then the baicalin gel was applied to the skin surface of probe *in vivo*. The baicalin concentration of skin microdialysates was determined, the time curve of baicalin concentration was drawn and the topical pharmacokinetics parameters of percutaneous absorption was calculated. **Results** Baicalin was optimized at the transitions m/z 447.3→271.2. The linearity correlation was good and the assay exhibited good precision and accuracy. The subcutaneous probe recovery of baicalin *in vivo* was (24.40±0.91)% and was stable over the 240 min study period. Baicalin could be detected in the microdialysis samples after transdermal administration, and its concentration continued to rise in 8 h. AUC₀₋₁ in skin tissue was (50.04±34.17) mg·min·L⁻¹. **Conclusion** The method of skin microdialysis *in vivo* could be used in the local pharmacokinetic research of baicalin.

【Key words】 baicalin gel; microdialysis; dermatopharmacokinetics; rat

三黄膏是目前临床常用于疮疡初起、红肿热痛及轻度烫伤等症的外用复方中药制剂,由黄柏、黄芩、黄连及栀子与适宜基质组成,具有清热解毒、消肿止痛之功效。其中,黄芩是一味非常重要的中药,其主要成分黄芩苷具有良好的抗炎、抗菌、抗病毒、

抗变态反应等药理活性^[1]。在体皮肤微透析技术可以对实验动物或人体皮肤组织进行在体、连续的药物浓度测定,现已广泛用于外用制剂的在体经皮吸收动力学研究^[2]。为进一步研究三黄膏经皮给药的体内过程,本研究将其主要活性成分黄芩苷制成外用凝胶,用在体皮肤微透析法研究黄芩苷经大鼠皮肤吸收的局部药动学。

1 材料

1.1 药物和试剂 黄芩苷对照品(纯度 98%,中国

【基金项目】 上海市卫生局课题(20114061);上海市教委预算内项目(2013JW51);上海市药理学学会皮肤药理学专业委员会基金(No. 201302)。

【作者简介】 娄月芬,硕士,副主任药师。E-mail: louyuefen@sina.cn。

【通讯作者】 朱全刚,博士,副主任药师。E-mail: qgzhu@126.com。

药品生物制品检定所,批号 110715-201016); 甲醇(色谱纯,美国 Merck 公司); 蒸馏水(第二军医大学附属长海医院药学部); Veet 脱毛膏(法国 Veet 公司); 其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器 W201 型恒温水浴锅(上海申生科技有限公司); PHS-3TC 精密酸度计(上海天达仪器有限公司); DSHZ300 多用途恒温水浴振荡器(江苏省太仓市实验设备厂); FA-2004 万分之一电子天平(上海天平仪器厂); 十万分之一电子天平(德国 Sartorius 公司)。MD1001 灌注器推进泵、MD-1020-K 四联流量控制器和容量为 1 ml 的灌注器(美国 BAS 公司); 线性探针(膜长 30 cm)。90-1 型磁力搅拌器(上海振荣科学仪器有限公司)。G 6410A HPLC-MS/MS 联用仪(配有三重四级杆 LC-MS 系统、G1311 四元泵、G1322 真空泵、G1329A 自动进样器和 G1316A 柱温箱,美国安捷伦公司)。

1.3 实验动物 雄性 SD 大鼠,体重约 200 g,由第二军医大学实验动物中心提供,实验动物许可证号: SCXK(沪) 2007-0003。

2 方法和结果

2.1 色谱条件 XTerraR MS C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 150 mm 5 μm,美国 Waters 公司); 流动相: 甲醇: 水(含 2 mmol/L 甲酸铵,用甲酸调节 pH 至 3.5) = 85: 15; 流速: 0.4 ml/min; 柱温: 35°C; 进样量: 1 μl。

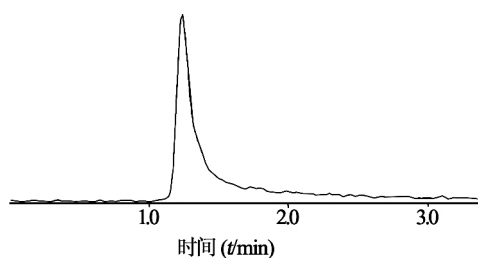


图 1 黄芩苷的总离子流色谱图

2.2 质谱条件 离子源为电喷雾电离源(ESI),正离子扫描方式及多离子反应方式(MRM)检测; 干燥气(N₂)温度为 350°C,流速为 10 L/min; 毛细管电压为 4 000 V; 雾化压力为 40 psi,裂解电压为 122 V; 检测时间 3 min。在一级全扫描质谱图中获得黄芩苷的准分子离子峰为 m/z 447.3,选择性对其进行二级质谱分析,得到主要碎片离子为 m/z 271.2,仪器自动优化相对碰撞能量为 21 eV。将上述离子对用于定量分析。

2.3 微透析介质的配制 分别称取无水枸橼酸 0.73 g, 二水枸橼酸钠 2.2 g, 无水葡萄糖 2.45 g, 依

地酸二钠 0.4 g, 半胱氨酸 0.2 g, 溶解于蒸馏水中,定容至 1 000 ml,用 0.45 μm 的水系微孔滤膜过滤,即得微透析介质(pH 3.95)。

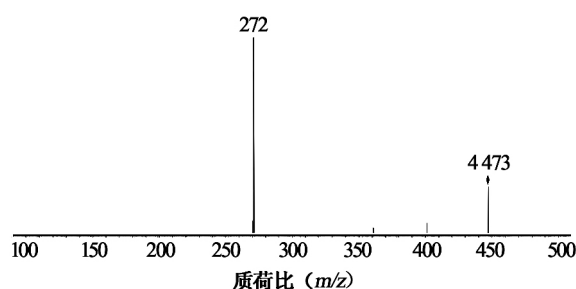


图 2 黄芩苷的质谱图

2.4 系列浓度对照品溶液的配制 精密称取适量黄芩苷对照品置于 100 ml 容量瓶中,用微透析介质溶解并稀释至刻度,配制成 10 μg/ml 的黄芩苷储备液。依次精密量取该储备液适量,置于 10 ml 容量瓶中,用微透析介质稀释至刻度,摇匀,配制成 2.5、10、20、50、100、200 ng/ml 的系列浓度对照品溶液。

2.5 标准曲线的制备及方法学考察

2.5.1 标准曲线的制备 精密量取系列浓度对照品溶液各 1 μl,分别进样测定,以黄芩苷对照品的峰面积 Y 对相应的浓度 X (ng/ml) 进行线性回归,得微透析样品标准曲线,回归方程为 $Y = 14.11X - 8.85$ ($r = 0.9997$),线性范围为 2 ~ 200 ng/ml。

2.5.2 方法专属性 分别取大鼠腹部皮肤给予空白凝胶 2 h、黄芩苷凝胶 2 h 后的皮下微透析样品进行 HPLC-MS/MS 分析,结果表明,空白凝胶给药后皮下微透析样品未见待测物本底以及其他干扰物质影响黄芩苷的测定。

2.5.3 精密度试验 分别量取低(2 ng/ml)、中(20 ng/ml)、高(200 ng/ml) 3 种浓度的对照品溶液,在 1 d 内测定黄芩苷浓度 5 次,得日内 RSD 分别为 2.22%、0.26%、0.28% ($n = 5$); 连续进样 3 d,得日间 RSD 分别为 3.17%、1.20%、2.08% ($n = 5$),表明精密度良好。

2.5.4 稳定性试验 采用微透析介质分别配制低(1 μg/ml)、中(4 μg/ml)、高(10 μg/ml) 3 种浓度的对照品溶液,置于 37°C 水浴中加热 24 h,适当稀释后进样测定,结果分别相当于配制浓度的 103.88%、97.39%、97.98%,表明黄芩苷在透析及样品测定过程中稳定性好。

2.6 黄芩苷凝胶处方及制作方法

2.6.1 处方 黄芩苷 2 g,羟丙甲纤维素(HPMC E3-2V) 10 g,聚乙二醇 400(PEG 400) 5 g,甘油 20 g,

氮酮 5 g, 无水枸橼酸 0.073 g, 二水枸橼酸钠 0.22 g, 蒸馏水加至总量 100 g。

2.6.2 制作方法 取无水枸橼酸、二水枸橼酸钠溶于适量蒸馏水中, 加入羟丙甲纤维素溶胀, 备用; 另取聚乙二醇、甘油、氮酮, 加入黄芩苷, 充分搅拌均匀得黄芩苷溶液, 将此加入前述羟丙甲纤维素溶液, 用蒸馏水补足至 100 g, 搅匀, 即得凝胶。

2.7 实验动物处理 取 SD 大鼠, 体重约 200 g, 实验前 1 d 用脱毛膏去除腹部毛。实验前用 25% 乌拉坦溶液 3 ml/kg 腹腔注射麻醉动物, 将大鼠腹部朝上固定于保温垫上, 使其体温维持在 37.5℃ 左右。将 2 根线性微透析探针(膜长 30 mm, 截留相对分子质量 5 000) 用 18G 穿刺针引导平行植入皮下后(间隔 2 cm), 引导针抽回而微透析探针膜管留于大鼠皮下组织中, 将探针连接于微透析装置。

2.8 大鼠体内黄芩苷回收率测定 以微透析介质配制浓度为 4 μg/ml (C_{perf}) 的黄芩苷灌流液, 2 只 SD 大鼠分别植入 2 根探针, 灌注速度 3 μl/min, 平衡 90 min 后, 每 20 min 收集一次透析液, 各收集 12 个样品, 用 HPLC-MS/MS 测定药物浓度 (C_{dial})。根据公式^[2] $R_{dial} = (C_{perf} - C_{dial}) / C_{perf}$ 计算黄芩苷的体内回收率为 (24.40 ± 0.91) % ($n = 4$)。240 min 内各取样点回收率保持稳定。

2.9 黄芩苷凝胶经皮吸收局部的药动学过程 采用 4 只 SD 大鼠建立微透析系统, 每只大鼠植入 2 根探针, 用不含药物的微透析介质灌注探针 90 min 后, 在透析窗正上方局部皮肤用 2% 黄芩苷凝胶 1 g 包封, 平衡 40 min 后, 每隔 20 min 收集 1 次透析液, 收集 8 h, 用 HPLC-MS/MS 测定药物浓度 (C_{dial}), 所测浓度经回收率校正后即成为皮下组织中药物浓度 ($C_{tiss} = C_{dial} / R_{dial}$)。该凝胶经皮给药后 40 min 至 8 h 内微透析液中均可检测到黄芩苷的存在, 且药物在皮肤组织内浓度持续升高, AUC_{0-1} 为 (50.04 ± 34.17) (mg · min) / L。

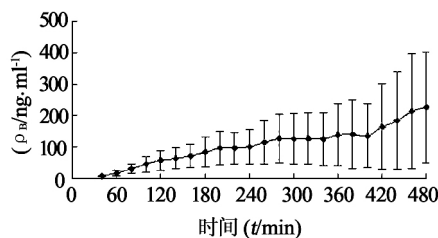


图3 黄芩苷凝胶给药的大鼠皮肤药物浓度-时间曲线 ($n = 8$)

3 讨论

在体皮肤微透析样品体积小, 所含药物浓度低,

因此对分析方法的灵敏度要求很高。HPLC-MS/MS 法具有高效、快速、灵敏度高、特异性强等特点, 因而广泛应用于在体皮肤微透析样品的分析。探针植入皮下所造成的创伤十分轻微, 但亦可产生红斑、引起组织中小分子物质浓度和组织血液灌注量的改变, 从而影响研究结果。因此在探针植入后到局部给药前需有一段平衡时间, 通常为 60 ~ 90 min^[2]。

在微透析取样方法中, 探针回收率的准确校正是获得组织液内真实药物浓度的关键。李洁等^[3] 在前期研究中已采用微透析联用 HPLC 法测定透析液中黄芩苷的浓度, 结果表明, 随着流速增加, 回收率降低, 并且增量法和减量法测得的回收率随流速的变化趋势相对一致。用不同浓度的灌流液, 黄芩苷回收率差异很小, 表明灌流液浓度对黄芩苷的回收率几乎没有影响。在灌流液速度相同的实验条件下, 增量法和减量法测定结果比较一致, 即黄芩苷通过微透析膜不存在扩散方向依赖性。因此, 本研究将微透析技术应用到黄芩苷的皮肤药动学研究时, 采用减量法测定黄芩苷的体内探针回收率。

黄芩苷的稳定性受温度、pH 值等多种因素影响, 其稳定 pH 值范围为 3 ~ 4^[4]。本研究未采用李洁等研究中选择的 PBS (pH 5.5) 作为体内微透析的灌流介质。究其原因, 在体内探针回收率研究过程中发现, 在 pH 5.5 条件下, 由于 SD 大鼠皮下生理条件的影响, 微透析液中黄芩苷浓度很低, 难以准确检测。在参考有关文献^[5] 的基础上, 采用改良的枸橼酸葡萄糖抗凝溶液 (anticoagulant citrate dextrose) 作为微透析介质, 内含有 3.5 mmol/L 枸橼酸、7.5 mmol/L 枸橼酸钠、136.0 mmol/L 葡萄糖及抗氧化剂 0.02% 半胱氨酸和 0.04% 依地酸二钠, 此溶液中黄芩苷的稳定性满足分析要求, 且在大鼠体内的探针回收率亦稳定。

从黄芩苷凝胶经皮给药局部药动学过程可以看出, 黄芩苷能够较迅速透过皮肤, 在实验的 8 h 内浓度持续增加, 尚未达到最高浓度, 下一步的研究中将延长实验时间。在实验过程中发现, 黄芩苷凝胶的皮下浓度在各个探针和大鼠之间存在差异, 其原因可能是各大鼠对药物的皮肤屏障作用以及皮肤代谢作用不一致, 而非微透析技术自身缺陷所造成的。本研究成功建立了 HPLC-MS/MS 法检测大鼠皮下微透析样品中黄芩苷的含量, 并考察了黄芩苷凝胶给药后皮肤局部组织的药动学过程, 表明在体皮肤微透析法可用于黄芩苷经皮吸收局部药动学研究。

【参考文献】

[1] 王雷,王学艳,周雪琴,等. 黄芩苷凝胶设计与体外透皮性能的研究[J]. 中草药, 2008, 39(10): 1502-1504.
[2] 陈芳,胡晋红,朱全刚. 用微透析法测定氢溴酸东莨菪碱凝胶经皮给药大鼠体内药动学研究[J]. 药学服务与研究, 2012, 12(4): 270-273.
[3] 李洁,朱全刚,尤本明,等. 采用微透析联用 HPLC 法测定透析液中黄芩苷的浓度[J]. 药学服务与研究, 2012, 12(1): 73-74.

[4] Xing J, Chen X, Zhong D. Stability of baicalin in biological fluids *in vitro* [J]. J Pharm Biomed Anal, 2005, 39(3-4): 593-600.
[5] Huang H, Zhang Y, Yang R *et al.* Determination of baicalin in rat cerebrospinal fluid and blood using microdialysis coupled with ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2008, 874(1-2): 77-83.

【收稿日期】 2014-01-02 【修回日期】 2014-09-03
【本文编辑】 陈静

(上接第 404 页)

[15] Kim BJ, Kim MJ, Park JM, *et al.* Reduced neurogenesis after suppressed inflammation by minocycline in transient cerebral ischemia in rat [J]. J Neurol Sci, 2009, 279(1-2): 70-75.
[16] Corsani L, Bizzoco E, Pedata F, *et al.* Inducible nitric oxide synthase appears and is co-expressed with the neuronal isoform in interneurons of the rat hippocampus after transient ischemia induced by middle cerebral artery occlusion [J]. Exp Neurol, 2008, 211(2): 433-440.
[17] Mohammadi MT, Shid-Moosavi SM, Dehghani GA. Contribution of nitric oxide synthase (NOS) in blood-brain barrier disruption during acute focal cerebral ischemia in normal rat [J]. Pathophysiology, 2012, 19(1): 13-20.
[18] Kubo K, Nakao S, Jomura S, *et al.* Edaravone, a free radical scavenger, mitigates both gray and white matter damages after global cerebral ischemia in rats [J]. Brain Res, 2009, 1279: 139-146.
[19] Nurmi A, Miettinen TK, Puolivali J, *et al.* Neuroprotective properties of the non-peptidyl radical scavenger IAC in rats following transient focal cerebral ischemia [J]. Brain Res, 2008, 1207: 174-181.
[20] Cunningham LA, Wetzel M, Rosenberg GA. Multiple roles for MMPs and TIMPs in cerebral ischemia [J]. Glia, 2005, 50(4): 329-339.
[21] Rosenberg GA. Matrix metalloproteinases in neuroinflammation [J]. Glia, 2002, 39(3): 279-291.
[22] Xu L, Xiong X, Ouyang Y, *et al.* Heat shock protein 72 (Hsp72) improves long term recovery after focal cerebral ischemia in mice [J]. Neurosci Lett, 2011, 488(3): 279-282.
[23] Qi D, Liu H, Niu J, *et al.* Heat shock protein 72 inhibits c-Jun N-terminal kinase 3 signaling pathway via Akt1 during cerebral ischemia [J]. J Neurol Sci, 2012, 317(1-2): 123-129.
[24] Stetler RA, Gan Y, Zhang W, *et al.* Heat shock proteins: cellular and molecular mechanisms in the central nervous system [J]. Prog Neurobiol, 2010, 92(2): 184-211.
[25] Barreto GE, White RE, Xu L, *et al.* Effects of heat shock protein 72 (Hsp72) on evolution of astrocyte activation following stroke in the mouse [J]. Exp Neurol, 2012, 238(2): 284-296.
[26] Muhammad S, Barakat W, Stoyanov S, *et al.* The HMGB1 receptor RAGE mediates ischemic brain damage [J]. J Neurosci,

2008, 28(46): 12023-12031.
[27] Chang WJ, Toledo-Pereyra LH. The role of HMGB1 and HSP72 in ischemia and reperfusion injury [J]. J Surg Res, 2011, 166(2): 219-221.
[28] Strbian D, Durukan A, Pitkonen M, *et al.* The blood-brain barrier is continuously open for several weeks following transient focal cerebral ischemia [J]. Neuroscience, 2008, 153(1): 175-181.
[29] Mohagheghi F, Bigdeli MR, Rasoulian B, *et al.* The neuroprotective effect of olive leaf extract is related to improved blood-brain barrier permeability and brain edema in rat with experimental focal cerebral ischemia [J]. Phytomedicine, 2011, 18(2-3): 170-175.
[30] Xiong ZG, Zhu XM, Chu XP, *et al.* Neuroprotection in ischemia: blocking calcium-permeable acid-sensing ion channels [J]. Cell, 2004, 118(6): 687-698.
[31] Pandey AK, Hazari PP, Patnaik R, *et al.* The role of ASIC1a in neuroprotection elicited by quercetin in focal cerebral ischemia [J]. Brain Res, 2011, 1383: 289-299.
[32] Lee BK, Lee DH, Park S, *et al.* Effects of KR-33028, a novel Na⁺/H⁺ exchanger-1 inhibitor, on glutamate-induced neuronal cell death and ischemia-induced cerebral infarct [J]. Brain Res, 2009, 1248: 22-30.
[33] Kim YR, Kim HN, Jang JY, *et al.* Electroacupuncture confers beneficial effects through ionotropic glutamate receptors involving phosphatidylinositol-3 kinase/Akt signaling pathway in focal cerebral ischemia in rats [J]. Eur J Integr Med, 2012, 4(4): e413-e420.
[34] Im DS, Jeon JW, Lee JS, *et al.* Role of the NMDA receptor and iron on free radical production and brain damage following transient middle cerebral artery occlusion [J]. Brain Res, 2012, 1455: 114-123.
[35] Benakis C, Bonny C, Hirt L. JNK inhibition and inflammation after cerebral ischemia [J]. Brain Behav Immun, 2010, 24(5): 800-811.
[36] Emanuelli C. Nerve growth factor promotes angiogenesis and atherogenesis in ischemic hindlimbs [J]. Circulation, 2002, 106(17): 2257-2262.

【收稿日期】 2013-06-07 【修回日期】 2013-12-20
【本文编辑】 李睿旻