

# 采用微透析法研究雷公藤甲素在正常和糖尿病大鼠皮肤中的药动学差异

张紫萍<sup>1\*</sup>, 曾维东<sup>1</sup>, 郭秀彩<sup>1</sup>, 赵博欣<sup>2</sup>, 邓英光<sup>1</sup>(1.广州市第十二人民医院, 广州 510620; 2.南方医科大学南方医院, 广州 510400)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)19-2641-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.19.16

**摘要** 目的:研究雷公藤甲素在正常和糖尿病大鼠皮肤中的药动学差异,为其临床合理应用提供参考。方法:将12只Wistar大鼠随机分为正常组和糖尿病模型组(ip 0.1%链脲佐菌素造模),每组6只。两组大鼠分别于腹部皮肤给予雷公藤甲素乳膏0.5 g后,采用微透析法每30 min收集1管透析液,连续12 h。采用高效液相色谱-质谱联用(HPLC-MS/MS)技术检测皮下药物浓度,分析比较两组大鼠皮下药物浓度-时间曲线图,并采用WinNonlin 5.0.1软件计算药动学参数。结果:正常组和糖尿病模型组大鼠皮下药物 $c_{\max}$ 分别为 $(1.54 \pm 0.37)$ 、 $(5.12 \pm 1.34)$   $\mu\text{g/ml}$ ,  $t_{\max}$ 分别为 $(7.32 \pm 0.24)$ 、 $(6.21 \pm 0.35)$  h,  $\text{AUC}_{0-12\text{h}}$ 分别为 $(12.65 \pm 4.64)$ 、 $(37.43 \pm 5.23)$   $\mu\text{g} \cdot \text{h/ml}$ ,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论:糖尿病引起大鼠皮肤结构的改变会造成雷公藤甲素经皮透过量增加,用药时应酌情减小剂量,以减少毒副作用。

**关键词** 雷公藤甲素;微透析法;皮肤药动学;糖尿病;经皮透过量;大鼠

## Study on Dermal Pharmacokinetic Difference of Triptolide in Normal and Diabetic Rats by Microdialysis

ZHANG Ziping<sup>1</sup>, ZENG Weidong<sup>1</sup>, GUO Xiucui<sup>1</sup>, ZHAO Boxin<sup>2</sup>, DENG Yingguang<sup>1</sup>(1.Guangzhou 12th People's Hospital, Guangzhou 510620, China; 2.Nanfeng Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510400, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To study the dermal pharmacokinetic difference of triptolide in normal and diabetic rats, and to provide reference for rational drug use in the clinic. METHODS: 12 Wistar rats were randomly divided into normal group and diabetic model group (0.1% streptozotocin intraperitoneally), with 6 rats in each group. Both group were given Triptolide cream 0.5 g to abdominal skin, and dialysate was collected by microdialysis every 30 min for consecutive 12 h. Subcutaneous concentration was detected by HPLC-MS, and subcutaneous concentration-time curves were analyzed and compared between two groups, and WinNonlin 5.0.1 software was used to calculate pharmacokinetic parameters. RESULTS: The pharmacokinetic parameters of normal group and diabetic model group were that  $c_{\max}$  were  $(1.54 \pm 0.37)$  and  $(5.12 \pm 1.34)$   $\mu\text{g/ml}$ ;  $t_{\max}$  were  $(7.32 \pm 0.24)$  and  $(6.21 \pm 0.35)$  h;  $\text{AUC}_{0-12\text{h}}$  were  $(12.65 \pm 4.64)$  and  $(37.43 \pm 5.23)$   $\mu\text{g} \cdot \text{h/ml}$ , with statistical significance ( $P < 0.05$ ). CONCLUSIONS: The change of dermal structure caused by diabetes can increase percutaneous penetration amount of triptolide in rats, and drug dosage should be reduced according to circumstances so as to reduce side effects.

**KEYWORDS** Triptolide; Microdialysis; Dermal pharmacokinetics; Diabetes; Percutaneous penetration amount; Rats

糖尿病(Diabetes mellitus)是一种以血糖长时间高于标准值为特征的代谢性疾病,通常伴有各种并发症<sup>[1-2]</sup>,其中皮肤病变的发生率达到25%~30%<sup>[3-4]</sup>。皮肤病变后会导致皮肤结构发生改变、角质层屏障功能减弱,因此糖尿病患者使用治疗窗比较窄的经皮给药制剂时,应更加注意给药剂量的选择。

雷公藤甲素(Triptolide)是中药雷公藤的主要有效成分,具有显著的抗炎、镇痛和免疫抑制作用,其常通过经皮给药用于治疗关节炎、红斑狼疮等疾病<sup>[5-6]</sup>。雷公藤甲素有明显的肝肾毒性,有效剂量和中毒剂量很接近,临床使用时应特别注意给药剂量<sup>[7]</sup>。糖尿病患者由于皮肤角质层的屏障功能减弱,雷公藤甲素经皮吸收会发生变化。笔者前期以糖尿病模型大鼠皮肤为模型的体外经皮渗透研究发现,雷公藤甲素在糖尿病模型大鼠皮肤的渗透性明显增加<sup>[8]</sup>。为了进一步探讨雷公藤甲素在正常大鼠皮肤和糖尿病大鼠皮肤中药动学的差异,笔者采用微透析(Microdialysis)技术对雷公藤甲素乳膏经正常

大鼠和糖尿病模型大鼠皮肤给药后的药动学行为进行考察,以期对雷公藤甲素的临床合理应用提供参考。

## 1 材料

### 1.1 仪器

S1200型高效液相色谱(HPLC)仪(包括6460型三重四级杆液相色谱-串联质谱仪、Agilent Mass Hunter色谱管理系统)购自美国Agilent公司;CMA/402微透析泵、微量注射器(规格:1.0、2.5 ml)、CMA20 Elite同心环形微透析探针(活性透析膜长度:10 mm,截留分子量:5 000 Da)均购自北京英博利达科技发展有限公司。

### 1.2 药品与试剂

雷公藤甲素对照品(中国科学院成都生物研究所,批号: MUST-14092510,纯度:≥98%);雷公藤甲素原料药(福建汉堂生制药股份有限公司,批号:20141023,纯度:98%);雷公藤甲素乳膏(广州市第十二人民医院自制,批号:20150701,规格:含雷公藤甲素1%);链脲佐菌素(STZ,美国Sigma公司,纯度:≥98%);水为去离子水,甲醇为色谱纯,其余试剂均为分

\*副主任药师。研究方向:医院药学。电话:020-38665695。E-mail: zzp08@126.com

析纯。

### 1.3 动物

SPF级Wistar大鼠12只,♂,体质量200~220 g,购自南方医科大学实验动物中心,实验动物合格证号为SCXK(粤)2006-0015。

## 2 方法与结果

### 2.1 糖尿病大鼠模型的建立

将12只大鼠随机分为2组,每组6只,分别为正常组和糖尿病模型组。糖尿病模型组以45 mg/kg的剂量ip 1% STZ进行造模<sup>[9]</sup>,并分别于造模后3、7、14、28 d检测大鼠尾尖血糖,以血糖>16.7 mmol/L作为造模成功标准;正常组大鼠ip等量生理盐水。

### 2.2 雷公藤甲素含量测定方法<sup>[9]</sup>

2.2.1 色谱条件 色谱柱:Agilent ZORBAX-C<sub>18</sub>(50 mm×4.6 mm, 1.8 μm);流动相:甲醇-水(60:40);流速:0.3 ml/min;柱温:30℃;进样量:10 μl。

2.2.2 质谱(MS/MS)条件 离子源:电喷雾电离(ESI)<sup>+</sup>;电离电压:+4.0 kV;离子源温度:110℃;干燥气温度:350℃;流量:7 L/min;检测模式:多重反应监测(MRM),检测离子对:*m/z* 361.1→91.1;裂解电压:135 V;碰撞电压:55 eV。

2.2.3 专属性考察 取腹部皮下空白基质灌流液(生理盐水)、含雷公藤甲素灌流液按上述分析条件测定。雷公藤甲素的保留时间为2.715 min,灌流液不干扰雷公藤甲素的测定,表明方法专属性良好,详见图1。

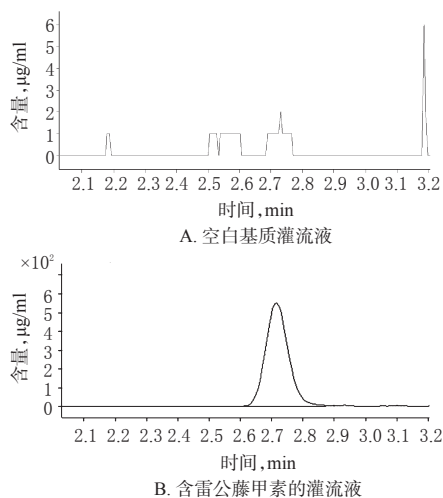


图1 HPLC-MS/MS图

Fig 1 HPLC-MS/MS chromatograms

2.2.4 线性关系考察 取雷公藤甲素对照品贮备液(10 mg/ml, 溶剂为甲醇),用空白灌流液逐级稀释得质量浓度分别为10.000、5.000、2.500、1.000、0.500、0.100、0.010 μg/ml的系列对照品溶液,按上述方法进行测定。以雷公藤甲素质量浓度为横坐标(*x*, μg/ml)、峰面积为纵坐标(*y*)进行线性回归,得回归方程为 $y=913.27x-1.98$ ( $r=0.9998$ )。结果显示,雷公藤甲素在0.010~10.000 μg/ml质量浓度范围内线性关系良好。当信噪比为10时,定量限为0.010 μg/ml。

2.2.5 精密度、稳定性、基质效应考察 依法进行各项考察试验。结果日内、日间RSD均小于2%;稳定性试验结果表明样品在24 h内稳定稳定。考察腹部皮下样品的基质效应结果显示,基质与空白灌流液样品相比,基质效应都接近1,表明基质

不影响雷公藤甲素的准确测定。

2.2.6 雷公藤甲素探针体外回收率测定 将微透析探针分别置于盛有5.000、1.000、0.500 μg/ml雷公藤甲素对照品溶液的西林瓶中,以生理盐水为灌注液、1.5 μl/min的灌注体积流量进行灌注;运行1 h平衡后,开始收集透析液,每次收集45 μl,共收集3次。按上述方法测定透析液中雷公藤甲素含量,计算其体外回收率(*R*): $R=c_{\text{透析液}}/c_{\text{对照品}}\times 100\%$ (式中 $c_{\text{透析液}}$ 为透析液中雷公藤甲素的质量浓度, $c_{\text{对照品}}$ 为雷公藤甲素对照品质量浓度)。计算得高、中、低雷公藤甲素对照品溶液中雷公藤甲素的体外回收率分别为(55.28±3.60)%、(52.75±1.77)%、(53.89±2.49)%。结果表明样品浓度对微透析的回收率影响不大,微透析法可以用于雷公藤甲素组织液取样。

2.2.7 雷公藤甲素探针体内相对损失率的测定 用反透析法测定探针在体内的相对损失率。在大鼠腹部皮下埋植1支探针,将探针与微透析装置相连,空白灌流液以1.5 μl/min灌注90 min,使探针周围组织恢复正常生理水平后依次用5.000、1.000、0.500 μg/ml雷公藤甲素对照品溶液作为灌流液。每次收集30 min样品(透析液),每个浓度收集3次(更换灌流液后先灌注90 min后再收集样品)。测定灌流液中雷公藤甲素的含量,计算探针体内相对损失率(*RL*): $RL=(c_{\text{灌流液}}-c_{\text{透析液}})/c_{\text{灌流液}}\times 100\%$ (式中 $c_{\text{透析液}}$ 为透析液中雷公藤甲素的质量浓度, $c_{\text{灌流液}}$ 为灌流液中雷公藤甲素的质量浓度)。计算得高、中、低雷公藤甲素对照品溶液中雷公藤甲素的体内相对损失率分别为(48.22±3.2)%、(47.99±2.7)%、(45.49±3.4)%。结果表明样品浓度对探针相对损失率影响不大,均为46%左右。

### 2.3 雷公藤甲素乳膏透皮吸收在体实验

将12只Wistar大鼠(♂)按“2.1”项下方法分组、造模后,ip 20%乌拉坦溶液麻醉,小心剃净腹部鼠毛,用穿刺针引导将探针植入皮下,将穿刺针抽回而探针膜管留于皮下组织,再将探针和微透析装置相连,以1.5 μl/min流速灌注生理盐水平衡90 min,并收集空白透析液。然后在探针上方皮肤处放置给药池,用胶带固定,在给药池内加入自制雷公藤甲素乳膏0.5 g,涂抹均匀,并在给药池上方覆盖保鲜膜防止水分蒸发,同时开始收集透析液,每30 min收集1次样品,连续取样至12 h。按上述方法测定透析液中雷公藤甲素质量浓度,然后按体内探针*RL*的结果校正,计算得皮肤组织中的实际雷公藤甲素的浓度( $c=c_{\text{透析液}}/RL$ ),并以大鼠皮肤组织实际雷公藤甲素质量浓度对时间作图,两组大鼠腹部皮下雷公藤甲素的药-时曲线图见图2。采用Winnonlin 5.0.1软件,以非房室模型-血管外给药途径模式进行药动学参数的计算,结果见表1。实验数据由SPSS 13.0软件处理,采用*t*检验进行组间比较。

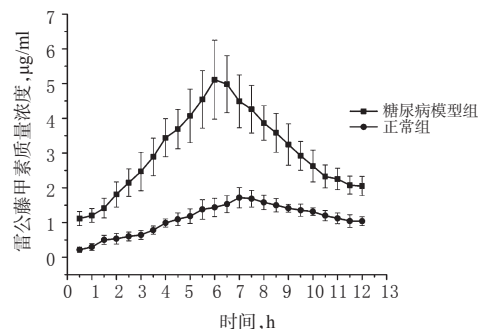


图2 两组大鼠腹部皮下雷公藤甲素的药-时曲线图

Fig 2 Drug concentration-time curves of triptolide in abdominal subcutaneous tissue of rats in 2 groups

表1 两组大鼠腹部皮下雷公藤甲素的药动学参数

Tab 1 Pharmacokinetic parameters of triptolide in abdomen subcutaneous tissue of rats in 2 groups

参数	糖尿病模型组	正常组
$c_{max}$ , $\mu\text{g/ml}$	$5.12 \pm 1.34^*$	$1.54 \pm 0.37$
$t_{max}$ , h	$6.21 \pm 0.35^*$	$7.32 \pm 0.24$
$AUC_{0-12h}$ , $\mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$	$37.43 \pm 5.23^*$	$12.65 \pm 4.64$

注:和正常组比较, \* $P < 0.05$

Note: vs. normal group, \* $P < 0.05$

由结果可见,雷公藤甲素乳膏经皮给药后,糖尿病大鼠皮下  $c_{max}$  和  $AUC_{0-12h}$  分别为  $(5.12 \pm 1.34) \mu\text{g/ml}$ 、 $(37.43 \pm 5.23) \mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$ , 显著高于正常组大鼠的  $(1.54 \pm 0.37) \mu\text{g/ml}$ 、 $(12.65 \pm 4.64) \mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$  ( $P < 0.05$ )。同时,糖尿病模型组大鼠由于皮肤吸收加快,  $t_{max}$  显著低于正常组 ( $P < 0.05$ )。结果表明糖尿病模型组大鼠皮肤的透过性要高于正常组大鼠。

### 3 讨论

雷公藤甲素作为毒性比较大的药物,应严格控制剂量。糖尿病患者由于皮肤结构发生改变,外用雷公藤甲素更应注意用量,防止药物过量导致的毒副作用。笔者前期研究发现,雷公藤甲素对糖尿病模型大鼠皮肤体外渗透性要高于正常组大鼠。在本研究中,笔者首先建立了雷公藤甲素透析液的分析方法,由于皮肤组织液中药物浓度比较低,故采用了灵敏度更高的HPLC-MS/MS法来进行药物含量测定,定量限达到  $0.010 \mu\text{g/ml}$ ;同时建立了用微透析测定皮肤中雷公藤甲素的方法,其体内、外回收率均良好。

皮肤药动学的研究方法主要有两种:其一为胶带剥离角质层法<sup>[10-12]</sup>,即通过给药不同时间后,除去皮肤表面药物,用胶带剥离皮肤角质层,测定角质层和表皮真皮层中药物含量来进行皮肤药动学的研究。这种方法的缺点在于需要较多的动物进行实验,且由于动物存在个体化差异,会导致实验的误差比较大。其二为微透析法<sup>[9,13-14]</sup>,这种方法可以连续取样,避免了动物个体化差异,使得结果更加准确可靠;同时该方法操作简单,更适用于皮肤药动学的研究。

采用微透析法进行大鼠皮肤药动学研究时要注意以下问题<sup>[15]</sup>:(1)给大鼠剃去腹部鼠毛时应特别注意保护好皮肤,避免出现破损影响药物的经皮渗透;(2)实验过程中大鼠需要保持麻醉状态,但由于实验周期长,应注意麻醉药物的用量,并在实验过程中留意实验动物的状态,避免动物在实验中途死亡;(3)微透析探针有直线性探针、环形探针、同心型探针等不同的类型,其中直线性探针更适合皮肤药动学的研究;(4)探针截留分子质量的选择应根据目标分析化合物的分子质量来选择,同时应尽量避免内源性大分子进入灌流液中影响分析。雷公藤甲素的分子质量为  $360.4 \text{ Da}$ ,体内生物大分子的分子质量通常大于  $10\,000 \text{ Da}$ ,故选择截留分子质量为  $5\,000 \text{ Da}$  的探针。

研究表明,糖尿病患者皮肤结构发生了病理性变化,激素类药物和酮康唑的吸收增加<sup>[9]</sup>。本文通过在体实验进一步证实了雷公藤甲素在糖尿病模型大鼠的皮肤药动学的  $c_{max}$  和  $AUC_{0-12h}$  均显著高于正常大鼠。这说明糖尿病模型大鼠的皮肤结构发生了改变,大鼠腹部皮肤变薄,角质层的屏障功能削弱,使得雷公藤甲素能更多地进入皮肤内。体外经皮渗透的结果也表明,由于糖尿病模型大鼠皮肤结构的变化,雷公藤甲素在糖尿病模型大鼠腹部皮肤的滞留量也要高于正常大鼠,可以形成

“储库”并持续释放药物。如果糖尿病患者使用同样剂量的雷公藤甲素乳膏,则由于雷公藤甲素吸收的增加,很有可能导致不良反应的发生。

综上,本文通过微透析法研究了雷公藤甲素在糖尿病模型大鼠和正常大鼠腹部皮肤的皮肤药动学,进一步证明了糖尿病模型大鼠皮肤的透过性要高于正常大鼠,为雷公藤甲素乳膏的临床合理应用提供了依据。

### 参考文献

- [1] Association AD. Diagnosis and classification of diabetes mellitus[J]. *Diabetes Care*, 2013, 36(1):67.
- [2] 中华医学会糖尿病学分会.中国2型糖尿病防治指南:2013版[J].中国糖尿病杂志,2014,6(7):2.
- [3] 林炜栋,钱雄,江万里,等.糖尿病皮肤病理生理改变及其机制的研究[J].同济大学学报:医学版,2012,33(2):1702.
- [4] 秦慷,陈璇.糖尿病皮肤瘙痒的病因病机探讨[J].中医学报,2013,28(3):401.
- [5] Li XJ, Jing ZZ, Zhang LY. Triptolide: progress on research in pharmacodynamics and toxicology[J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 155(1):67.
- [6] 韩菁婕,柳芳,张相林,等.雷公藤主要活性成分的结构修饰及药理活性研究进展[J].中国药房,2016,27(4):560.
- [7] 刘建群,洪沁,张维,等.凤尾草对雷公藤甲素的减毒作用[J].中国医院药学杂志,2010,30(6):443.
- [8] 张紫萍,郭秀彩,赵博欣,等.雷公藤甲素对糖尿病模型大鼠的经皮渗透特性研究[J].中国药房,2015,26(16):2181.
- [9] 庄志铨,苏碧雅,沈勇刚,等.微透析法研究酮康唑经正常大鼠和糖尿病大鼠皮肤透过性的差异[J].广东药学院学报,2013,29(2):124.
- [10] Klang V, Schwarz JC, Lenobel B, et al. In vitro vs. in vivo tape stripping: validation of the porcine ear model and penetration assessment of novel sucrose stearate emulsions[J]. *Eur J Pharm Bio Pharm*, 2012, 80(3):604.
- [11] 吴黎莉,周可,徐兰芳,等.胶带粘贴技术结合LC-MS法测定人体皮肤角质层中艾迪康唑浓度[J].中国药科大学学报,2014,45(1):79.
- [12] 吴修富,高培平,苑振亭,等.蛇床子素在人皮肤角质层和去角质层皮肤中的分布测定[J].中国医院药学杂志,2007,27(1):49.
- [13] Wan T, Xu T, Pan J, et al. Microemulsion based gel for topical dermal delivery of pseudolaric acid B: in vitro and in vivo evaluation[J]. *Int J Pharmaceut*, 2015, 493(1/2):111.
- [14] 徐月红,叶卉,郭秀彩,等.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[J].中草药,2012,43(2):336.
- [15] Shukla C, Bsahaw ED, Stagni G, et al. Applications of dermal microdialysis: a review[J]. *J Drug Deliv Sci Tec*, 2014, 24(3):259.

(收稿日期:2016-02-03 修回日期:2016-05-13)

(编辑:林静)