

HPLC - 荧光法测定 α - 细辛醚热熔压敏胶贴剂的相对生物利用度

俞振伟¹, 梁文权²

(1. 浙江大学医学院附属邵逸夫医院 杭州 310016; 2. 浙江大学药学院 杭州 310058)

摘要 目的:建立家兔血浆内 α - 细辛醚的 HPLC - 荧光测定法 研究 α - 细辛醚热熔压敏胶贴剂在家兔体内的相对生物利用度。方法:家兔给予 α - 细辛醚混悬液或 α - 细辛醚贴剂后于不同时间点采血 血浆样品处理后以甲醇 - 水(75:25)为流动相 使用 ZORBAX Eclipse XDB - C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm 5 μ m) 进行分离 流速 1.0 mL · min⁻¹, 荧光检测器激发波长为 265 nm 检测波长为 365 nm 测定血浆药物浓度 计算药物动力学参数和相对生物利用度。结果: α - 细辛醚在浓度 0.01 ~ 1 μ g · mL⁻¹ ($r=0.9998$) 范围内线性关系良好 检测限为 0.005 μ g · mL⁻¹, 方法学回收率为 96.2% ~ 102.0% , 日内与日间 RSD 均 < 4.5%。家兔口服 α - 细辛醚混悬液后的 AUC_{0- t} 为(0.53 ± 0.23) μ g · h · mL⁻¹ 贴剂给药的 AUC_{0- t} 为(7.86 ± 2.15) μ g · h · mL⁻¹ 贴剂的相对生物利用度为 1494%。结论:该法简便准确,可用于家兔血浆内 α - 细辛醚浓度的测定; α - 细辛醚热熔压敏胶贴剂的相对生物利用度高。

关键词: 细辛醚; 细辛脑; 高效液相; 荧光检测; 热熔压敏胶; 相对生物利用度

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254 - 1793 (2011)08 - 1444 - 04

HPLC with fluorescence determination of relative bioavailability of hot melt pressure sensitive adhesive α - asarone patch

YU Zhenwei¹, LIANG Wenquan²

(1. Sir Run Run Shaw Hospital, College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310016, China;

2. College of Pharmaceutical Science, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract Objective: To establish an HPLC method for the determination of α - asarone in rabbit plasma and to study the relative bioavailability of hot melt pressure sensitive adhesive patch. **Methods:** The plasma samples were collected at the predetermined time points after oral or transdermal administration. The plasma concentrations of α - asarone were determined by HPLC method using ZORBAX Eclipse XDB - C₁₈ (250 mm × 4.6 mm 5 μ m) column, methanol - water (75:25) as mobile phase, flow rate at 1.0 mL · min⁻¹ after pretreatment. The excitation wavelength and emission wavelength were 265 nm and 365 nm, respectively. The pharmacokinetics and relative bioavailability were studied. **Results:** A good linearity was obtained in the range of 0.01 - 1 μ g · mL⁻¹ ($r=0.9998$) with a detective limit of 0.005 μ g · mL⁻¹. The method recovery was between 96.2% - 102.0%. The relative standard deviations of within - day and between - day were less than 4.52%. The AUC_{0- t} of α - asarone after oral and transdermal administration were (0.53 ± 0.23) μ g · h · mL⁻¹ and (7.86 ± 2.15) μ g · h · mL⁻¹, respectively; the relative bioavailability of patch was 1494%. **Conclusion:** The established method is simple, accurate and suitable for the determination of α - asarone in rabbit plasma. The hot melt pressure sensitive adhesive patch containing α - asarone had shown high relative bioavailability.

Key words: asarone; asarin; HPLC; fluorescence detection; hot melt pressure sensitive adhesive; relative bioavailability

α - 细辛醚 (α - asarone) 又名 α - 细辛脑或细辛脑, 是中药石菖蒲挥发油中的主要有效成分之一。临床证明 α - 细辛醚对慢性气管炎、支气管

哮喘和癫痫大发作均有较好疗效^[1]。但由于 α - 细辛醚水溶性差, 口服生物利用度低^[2,3], 因此作者采用环境友好型的热熔压敏胶, 将其制成贴剂

给药以提高生物利用度。目前多采用 HPLC - UV 法测定 α - 细辛醚血药浓度^[4,5],操作复杂且检测限高,本文建立了家兔血浆中 α - 细辛醚的 HPLC - 荧光测定法,并考察其热熔压敏胶贴剂的相对生物利用度。

1 仪器和试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪(Agilent 公司,美国);精密分析天平(XP205 梅特勒 - 托利多公司);离心机(Eppendorf Mini Spin 德国);漩涡振荡器(天津药典标准仪器厂)。

α - 细辛醚对照品(武汉远城科技发展有限公司),肝素钠(上海神航生物科技有限公司),甲醇(上海陆都化学试剂厂,色谱纯),其余试剂均为分析纯。 α - 细辛醚热熔压敏胶贴剂为本实验室自制。

家兔,雄性 2.0 kg,浙江大学实验动物中心提供。动物许可证号 SCXK(浙 2007 - 0029)。

2 方法和结果

2.1 色谱条件 采用 Agilent ZORBAX Eclipse XDB - C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μ m),甲醇 - 水(75:25) 为流动相,流速 1.0 mL · min⁻¹,荧光检测器,激发波长 265 nm,检测波长 365 nm,进样体积 20 μ L。

2.2 对照品储备液的制备 精密称取 α - 细辛醚对照品适量,置于 100 mL 量瓶中,用甲醇配制成浓度为 10 μ g · mL⁻¹ 的溶液,于 4 °C 冰箱中保存,使用时用流动相稀释至所需浓度。

2.3 血浆样品处理 取血浆 0.1 mL,置于离心管中,加入甲醇 1 mL,漩涡振荡 3 min,12000 r · min⁻¹ 离心 10 min,取上清用甲醇定容至 2 mL。

2.4 给药与血样采集 家兔 6 只,随机分成 2 组。口服给药组,将 α - 细辛醚对照品 180 mg 配制成 1% 的 CMC - Na 混悬液,灌胃给药。给药后分别在 5,10,30,45 min 及 1,1.5,2,4,6,8,12 h 从耳缘静脉取血。经皮给药组,将家兔背部去毛处理后的皮肤上贴上一块面积为 120 cm² 的 α - 细辛醚贴剂(含 α - 细辛醚 180 mg)。在给药后 1,2,4,6,8,10,12,16,20,24 h 从耳缘静脉取血。血样用肝素抗凝,离心 5 min(6000 r · min⁻¹),分离血浆。

2.5 数据处理 在本研究使用 Thermo Kinetica 4.4.1 软件计算药物动力学参数,使用 MinTab 14 软件进行统计学处理。

2.6 方法学评价

2.6.1 专属性 本研究建立的色谱条件下, α - 细辛醚达到基线分离,具体色谱图如图 1 所示。血浆中的内源性物质不干扰原型药物的测定, α - 细辛醚的保留时间约为 6.3 min。

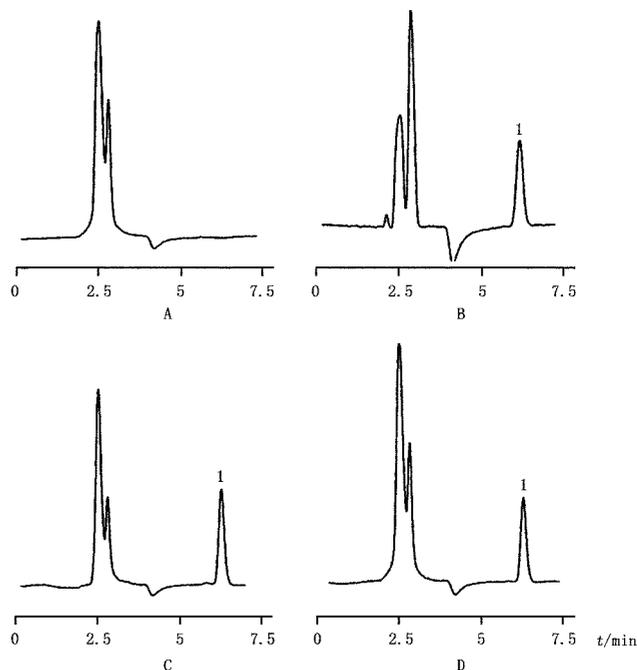


图 1 空白血浆(A)、 α - 细辛醚对照品(B)、空白血浆内加入 α - 细辛醚对照品(C)、家兔给药后血浆中的 α - 细辛醚(D) 色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of blank plasma (A), reference substance (B), blank plasma + reference substance (C) and plasma sample of rabbit after administration of α - asarone (D)
1. α - 细辛醚(α - asarone)

2.6.2 线性关系与最低定量限

分别吸取 α - 细辛醚对照品储备液(10 μ g · mL⁻¹ 甲醇溶液) 适量,加入空白血浆中,配制成 α - 细辛醚浓度分别为 0.01, 0.1, 0.2, 0.5, 0.8, 1 μ g · mL⁻¹ 的对照品血浆,按上述“血浆样品处理方法”处理后进行液相色谱分析,记录 α - 细辛醚色谱峰面积(A),以峰面积(A) 对浓度(C, μ g · mL⁻¹) 进行回归,得回归方程为:

$$A = 89.33C + 0.4187 \quad r = 0.9998$$

结果表明 α - 细辛醚在浓度 0.01 ~ 1 μ g · mL⁻¹ 范围内与峰面积线性关系良好。

取 α - 细辛醚浓度为 0.01 μ g · mL⁻¹ 的对照品血浆,按“血浆样品处理方法”项下处理后进行液相色谱分析。测定结果为(0.0101 ± 0.0005) μ g · mL⁻¹ (n = 6),相对回收率为 101.6%,RSD 为 4.5%,本法的最低定量限为 0.01 μ g · mL⁻¹, α - 细

辛醚的检测限为 $0.005 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.6.3 回收率试验 按“线性关系”项下配制 α -细辛醚浓度为 $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的低、中、高 3 个不同浓度的对照品血浆各 3 份,按“血浆样品处理方法”项下处理,进行液相色谱分析,记录 α -细辛醚色谱峰面积 A_1 。另外配制浓度为 $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液,进样并记录色谱峰面积 A_2 。以 A_1 、 A_2 之比求绝对回收率。另按回归方程计算实测浓度,以测得量与加入量的比值计算方法学回收率,结果低、中、高浓度的绝对回收率为 $(96.6 \pm 0.6)\%$ 、 $(89.5 \pm 3.8)\%$ 、 $(89.8 \pm 5.5)\%$;低、中、高浓度的方法学回收率为 $(102.0 \pm 0.6)\%$ 、 $(96.2 \pm 4.1)\%$ 、 $(96.7 \pm 5.9)\%$ 。结果表明,低、中、高浓度回收率均 $>85\%$,且平行性和精密度良好,符合血浆样品分析要求。

2.6.4 精密度试验 按“线性关系”项下配制浓度为 $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的低、中、高 3 个不同浓度的 α -细辛醚对照品血浆,按“血浆样品处理方法”项下处理,进行液相色谱分析,1 d 测定多次,计算日内差异和相对误差。不同浓度的样品不同日期测定多次,计算日间差异和相对误差。结果如表 1 所示,血浆样品分析的精密度 (RSD 均 $<4.5\%$) 和准确度 (diff 均 $<5.6\%$) 良好,符合测定要求。

表 1 α -细辛醚的日内和日间精密度 ($n=6$)

Tab 1 Intra-day and inter-day precision of α -asarone

浓度 (concentration) $/\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	日内 (intra-day)			日间 (inter-day)		
	均值	RSD	Diff	均值	RSD	Diff
	(mean value) $/\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	%	%	(mean value) $/\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	%	%
0.0996	0.0940	2.13	-5.62	0.0982	3.66	-1.43
0.4980	0.4958	0.17	-0.45	0.5051	2.73	1.42
0.9960	1.0433	4.52	4.76	1.0299	2.03	3.40

2.6.5 稳定性试验 按“线性关系”项下配制浓度为 $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的低、中、高 3 个不同浓度的 α -细辛醚血浆样品,考察在室温下放置 4 h、按“血浆样品处理方法”项下处理后放置 8 h、 -20°C 贮存 10 d、3 次冷冻-解冻循环后血浆中 α -细辛醚的稳定性。结果如表 2 所示,血浆中的 α -细辛醚在这些物理条件下稳定。

2.7 相对生物利用度 家兔给药后的血药浓度 -

时间曲线如图 2,使用 Thermo Kinetica 4.4.1 软件计算相关药物动力学参数见表 3。与口服给药相比,以贴剂进行经皮给药延迟了 T_{max} ($P < 0.1$),明显提高了 $\text{AUC}_{0 \rightarrow t}$ ($P < 0.05$),相对生物利用度 F 为 1494% 。

表 2 家兔血浆中 α -细辛醚的稳定性 ($n=6$)

Tab 2 Stability of α -asarone in rabbit plasma

考察条件 (test condition)	加入浓度 (added) $/\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	测得浓度 (found) $/\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	RSD /%	相对回收率 (relative recovery) /%
室温放置 4 h (4 h at room temperature)	0.0996	0.0941	1.45	94.47
	0.4980	0.5119	0.35	102.80
	0.9960	0.9915	0.13	99.55
处理后室温放置 8 h (8 h at room temperature after pretreatment)	0.0996	0.0957	0.96	96.11
	0.4980	0.4909	0.37	98.57
	0.9960	1.0026	0.26	100.67
-20°C 贮存 10 d (10 d at -20°C)	0.0996	0.0100	0.44	100.55
	0.4980	0.4542	0.15	91.20
	0.9960	1.0169	0.38	102.10
3 次冻融循环 (three freeze-thaw cycles)	0.0996	0.0899	1.83	90.25
	0.4980	0.4499	0.43	90.34
	0.9960	1.0324	0.15	103.66

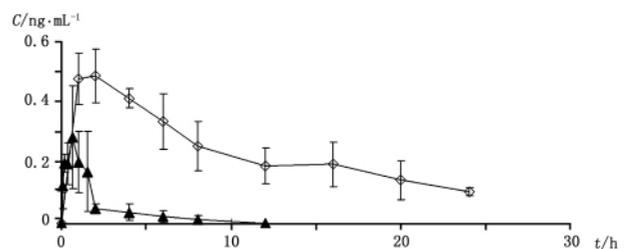


图 2 家兔给药后平均血药浓度-时间曲线 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

Fig 2 Mean plasma concentration-time curves after administration in rabbits

—▲—: 口服 (oral) —◇—: 贴剂 (patch)

表 3 药物动力学参数 ($n=3, (\bar{x} \pm s)$)

Tab 3 Pharmacokinetic parameters

药物动力学参数 (pharmacokinetic parameters)	口服 (oral)	贴剂 (patch)
$C_{\text{max}}/\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	0.30 ± 0.16	0.50 ± 0.08
T_{max}/h	0.56 ± 0.19	1.67 ± 0.58
$\text{AUC}_{0 \rightarrow t}/\mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$	0.53 ± 0.23	7.86 ± 2.15
F		1494%

3 讨论

目前报道的 α -细辛醚血药浓度测定方法多为 HPLC-UV 法, 样品前处理中均涉及萃取浓缩等步骤, 不仅操作烦琐, 且在浓缩过程中易造成样品损失, 回收率与精密度较低^[4, 5]。本文采用血浆沉淀蛋白后直接进行 HPLC-荧光测定, 操作简单, 回收率与精密度均较高。

由于 α -细辛醚不溶于水, 首过效应明显, 半衰期短, 因此口服生物利用度很低, 胶囊和片剂的生物利用度分别为 2.73% 和 5.56%^[3]。 α -细辛醚的相对分子质量为 208, 熔点 59~60 °C, logP 值为 2.3, 其理化性质符合经皮给药的要求, 将其制成贴剂后相对生物利用度显著提高。目前, 作为经皮给药贴剂主要材料的压敏胶, 大部分为溶剂型, 因而伴随着环境污染和能耗消耗大等问题; 近年来发展起来的乳液型压敏胶由于干燥速度慢、乳化剂迁移等原因也受到很大的限制^[6, 7]。热熔压敏胶常温下为固体, 熔融状态下涂布, 具有不含有机溶剂、低公害、涂布速度快、能耗低、皮肤刺激性小的优点。将 α -细辛醚制备成热熔压敏胶贴剂, 相对生物利用度为 1494%, 与有关文献报道的其他类型压敏胶所制备贴剂的相对生物利用度^[5]相当。

参考文献

- 1 ZHAO Li-hong(赵李宏), WU Jian-mei(吴建梅), WU Feng-lan(武凤兰). A review of recent ten-year study on α -asarone (α -细辛脑近 10 年研究概述). *China J Chin Meter Med* (中国中药杂志) 2007, 32(7): 562
- 2 WU Chuang(吴闯). Study on the bioavailability of asarone tablets (细辛脑片剂的生物利用度). *Chin Hosp Pharm J* (中国医院药学杂志) 2003, 23(10): 597
- 3 YANG Zhen-gong(杨正鸿), WU Chuang(吴闯). Study on bioavailability of α -asarone in human(α -细辛脑在人体的生物利用度研究). *Chin Hosp Pharm J* (中国医院药学杂志), 1997, 17(4): 165
- 4 ZHANG De-qin(张德芹), MA Rong(马融), LIU Chang-xiao(刘昌孝) et al. Pharmacokinetics study of α -asarone in Xiaoer Kangxian capsules(小儿抗痨胶囊中 α -细辛醚的药物动力学研究). *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药) 2002, 33(3): 247
- 5 JIANG Li-li(姜丽丽), XU Min(徐敏), JIN Da-yuan(金大源), et al. The relative bioavailability of α -asarum patch on rabbit(α -细辛醚贴剂的家兔相对生物利用度研究). *Chin J Mod Appl Pharm* (中国现代应用药学) 2002, 19(5): 390
- 6 Zbigniew C, Marta W. Development of solvent-free acrylic pressure-sensitive adhesives. *Eur Polym J* 2007, 43: 3604
- 7 Park MC, Lee MC. Effects of polymeric emulsifiers on the properties of acrylic emulsion pressure-sensitive adhesives. *J Appl Polym Sci*, 2004, 94(4): 1456

(本文于 2010 年 10 月 19 日收到)

《中国药材标准名录》已出版

科学出版社于 2011 年 4 月出版了由中国食品药品检定研究院林瑞超教授主编的《中国药材标准名录》, 该书是在国家药监局的大力支持和全国各省、自治区、直辖市药检所积极配合下, 从 2004 年开始, 收集整理历版药典、部颁标准、地方标准等大量资料, 历时 6 年, 进行了细致归纳整理, 编写了权威、实用的中药材标准检索专业工具书。该书共收录了 4700 余种药材, 涉及 530 个科, 内容涵盖药材名、科名、拉丁科名、类别(动物、植物或矿物)原动植物中文名、原动植物拉丁学名、药用部位及出处等; 本书科学性强、编写简明、内容实用, 是企业、医院、中医药科技工作者必备的、权威的药材标准检索专业工具书。

当当网、卓越网、新华书店及医学书店有售。定价 298.00 元。

邮购联系人: 温晓萍; 电话: 010-64034601, 64019031; 地址: 100717 北京市东黄城根北街 16 号科学出版社 温晓萍(请在汇款附言注明您购书的书名、册数、联系电话、是否要发票等)。