

高效毛细管电泳法测定伤痛外搽酊中毒性成分的透皮吸收量

蒋孟良 张春桃 林晓东¹ 易延達 张水寒² (长沙 410004 湖南中医学院药学院; ¹ 娄底 417000 娄底地区药检所; ² 长沙 410012 湖南省中医药研究院)

摘要 目的: 观察伤痛外搽酊中毒性成分在体内外透皮吸收强度。方法: 采用高效毛细管电泳法测定了毒性成分在体外的渗透量和动物体内血液中毒性成分的透皮吸收量。结果: 体外法表明土的宁、马钱子碱的平均透过率分别为: $0.563\mu\text{g}/\text{cm}^2\cdot\text{h}$ 和 $0.590\mu\text{g}/\text{cm}^2\cdot\text{h}$; 体内法表明伤痛外搽酊低、高剂量组家兔血液中均未检出乌头碱, 低剂量组家兔血液中未检出土的宁, 高剂量组家兔血液中土的宁含量为 $32.44\text{ng}/\text{ml}$ 。结论: 本品中土的宁在动物体内外均有极微量的透皮吸收作用, 乌头碱未见吸收。
关键词 伤痛外搽酊; 透皮吸收; 乌头碱; 土的宁; 含量测定; 高效毛细管电泳

Determination on quantum through skin of toxicant Composition in Shangtong Weicha Tincture by HPCE

Jiang Mengliang, Zhang Chuntao, Lin Xiaodong, Yi Yankui, Zhang Shuihan et al (College of Hunan College of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410004)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To observed intensity of penetration skin absorption of toxicant composition in Shangtong Weicha Tincture. **METHOD:** The osmotic quantum of toxicant composition in blood outside animal bodies and inside animal bodies was determined by HPCE. **RESULTS:** In vitro test indicated that the average penetration rate of strychnine and brucine are $0.563\mu\text{g}/\text{cm}^2\cdot\text{h}$ and $0.590\mu\text{g}/\text{cm}^2\cdot\text{h}$. In vivo test indicated that there are not aconitine in the rabbits bloods of low and high dosage. The low dosage are not strychnine. The strychnine in rabbits bloods of the high dosage was penetrated $32.44\text{ng}/\text{ml}$. **CONCLUSION:** The strychnine in the tincture which was penetrated skin is very microdose. Aconitine was not absorbed by skin of rabbits.

KEY WORDS Shangtong Weicha Tincture, penetration skin absorption, aconitine, strychnine, determination, HPCE

伤痛外搽酊主要由三七、红花、血竭、草乌、马钱子等药组成。具有活血祛瘀、消肿定痛之功, 主要用于软组织损伤之瘀血肿痛等症。因本品含多种有毒药, 为使其在临床上使用安全可靠, 作者对该药按新药外用要求, 进行了透皮吸收

试验。采用毛细管电泳法测定了不同剂量长期外搽该药后的家兔血液中的乌头碱与土的宁含量, 并测定了透过离体大鼠皮的马钱子碱和土的宁的含量。以观察伤痛外搽酊中毒性成分外用而透皮吸收的速率和血药浓度。

1 实验材料

1.1 药物: 伤痛外搽酊由株洲市运动创伤药物研究所提供, 批号 980418; 土的宁、马钱子碱、乌头碱对照品均由中国药品生物制品检定所提供; 其它试剂均为分析纯。

1.2 动物: 日本大耳白家兔 30 只, 体重 1.5~2.0kg, 雌雄各半, 由湖南中医学院实验动物中心提供, 合格证号: 湘医动字 (1995) 20-003.; 大白鼠 Wister, 购自湖南省中医药研究院动物室。

1.3 饲养条件: 单个分笼饲养, 由动物中心提供的全营养颗粒饲料饲养, 自由取食饮水, 室温 27~29℃。

1.4 仪器: 全自动电子天平 TP-1000 型, 湘仪天平仪器厂; 高效毛细管电泳仪 HPCE-3D 型, 美国惠普公司; 改良 Franz 扩散池 自制; 恒温水浴锅 H.HS214 型, 江苏省医疗器械厂。

2 实验方法与结果

2.1 体外法^[1]: 取大鼠用 8% 硫化钠脱去毛, 再用清水洗净, 饲养 3 天后, 放血处死动物, 剖去皮毛后的皮肤, 剥去皮下组织和脂肪, 并将其固定于给药室的下端, 于给药室加入伤痛外搽酊 5.0ml, 使角质层与药液接触, 上端加盖密闭。再将给药室下端浸入加有 50ml 生理盐水的 100ml 容积的扩散池中心, 浸入深度为给药室药液液面与扩散池生理盐水液面等高。扩散面积为 3.14cm²。池内循环水为 32±0.5℃, 不断搅拌, 加样平衡 15min, 开始计时, 取 0.2、4、6、8 小时样, 每次从扩散室中取样 5.0ml, 并立即补加 5.0ml INS。样品液用加氨水调 pH9, 用 CHCl₃ 萃取 (15ml×6 次), 萃取液蒸干溶剂, 复加甲醇溶解至 1.0ml 备用。

取各备用液分别置 10ml 具塞离心管中, 50℃ 左右氮气吹干, 加入用盐酸调 pH2.0 的甲醇液 50μl, 置快速混匀器上振荡 3~5 分钟, 用 HPCE 测定土的宁与马钱子碱的含量^[2]。(其色谱条件: 石英毛细管, 内径 50μm, 有效长度 72cm, 缓冲液为 0.03mol/L 磷酸二氢钾和 20% 乙腈液, 恒定电压为 20KV, 温度为 30℃, 进样量 20KPa.s, 检测波长为 210nm), 以土的宁、马钱子碱为对照品, 进样后测定峰面积, 外标法定量, 求得样品透过量, 结果见表 1。

表 1 土的宁、马钱子碱累计透皮量 (μg/cm², n=5)

时间(h)	2	4	6	8
土的宁	8.215	13.849	18.194	22.514
马钱子碱	8.513	15.010	19.747	23.589

以时间 t 为横坐标, 不同时间土的宁与马钱子碱平均累积透过量为纵坐标, 绘制透皮吸收曲线, 结果见图 1。

以时间 t 为自变量 x , 累积透皮吸收量为因变量 y , 对其回归, 并计算斜率, 其土的宁与马钱子碱的回归方程分别为: $y = 2.362x + 3.883$, $r = 0.9977$, $y = 2.498x + 4.224$, $r = 0.9929$; 斜率分别为: 2.383, 2.513。

2.2 体内法^[3]: 取体重 1.7~2.2kg 的健康家兔 6 只, 随机分为二组, 每只家兔背两侧剪毛 2 块, 面积 6×6cm², 第一组涂原药液 (13.783% 的伤痛外搽酊), 第二组涂 82.698% 的高浓度伤痛外搽酊, 每侧每次涂药液 1ml, 每日 2 次, 分别相当于临床用量的 10 倍与 60 倍, 每次间隔 6h, 连续 14 天。于末

次涂药后 1h 每兔心脏取血 6.0ml, 加入试管中 (事先加 10% 草酸钾溶液 0.1ml, 烘干, 备用), 摇匀, 加氨水调 pH9 同体外法萃取、处理, 制备 pH2.0 的甲醇液 50μl 样品供试液, 置快速混匀器上振荡 3~5 分钟, 再进样测定。取未涂药家兔血浆 6.0ml, 加含土的宁与乌头碱各 1mg/ml 的 CHCl₃ 液 0.05ml, 加氨水调 pH9, 同上萃取制备阳性对照液 1.0ml (各含 50μg/ml), 直接进样测定。(色谱条件: 石英毛细管, 内径 50μm, 有效长度 50cm, 缓冲液为 0.02mol/L 的磷酸盐, pH=7.0, 施加电压为 20KV, 温度为 25℃, 检测波长为 210nm, 进样量为 30KPa.s^[3-5]。以外标法计算含量。

测定结果表明: 低浓度 (13.783%) 伤痛外搽酊组家兔血液中未见乌头碱与土的宁; 高浓度 (82.698%) 组家兔血液中未见乌头碱, 其土的宁含量平均为每 ml 血液含 32.44±3.21ng (9.466, 10.622, 11.548, n=3), 结果见图 2~4。

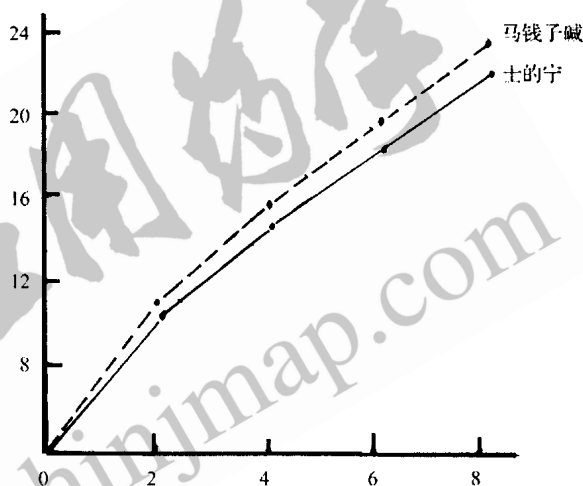


图 1 土的宁、马钱子碱累积透皮吸收量



图 2 乌头碱与土的宁对照品的 HPCE 图谱



图 3 伤痛外搽酊低剂量组的 HPCE 图谱



图 4 伤痛外搽酊高剂量组的 HPCE 图谱

3 讨论与小结

体外法实验表明,本品中土的宁、马钱子碱有一定的透皮吸收作用,其 8h 内二者的平均透过速率分别为 $0.563\mu\text{g}/\text{cm}^2\cdot\text{h}$ 和 $0.590\mu\text{g}/\text{cm}^2\cdot\text{h}$,累积透过总量分别为 $22.514\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 与 $23.589\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。

体内法实验表明,本品原药液与高浓度药液外涂 14 天后,低浓度组未发现血浆中有土的宁与乌头碱。高浓度组家兔血浆中未检出乌头碱,其土的宁在血中浓度为 $32.44\text{ng}/\text{mL}$ 。

作者与中国药品生物制品检定所对本品进行了毒性试验,其急毒试验表明,本品对完整皮肤和破损皮肤家兔外擦未见产生毒性反应,更无动物死亡;小鼠 SC 的 LD_{50} 三个批号分别为 10.41 ± 1.09 , 5.78 ± 0.35 , $7.17\pm 0.57\text{g}/\text{kg}$, op 二个批号分别为 35.29 ± 2.60 , $15.29\pm 2.12\text{g}/\text{kg}$, iv 一个批号为 $1.34\pm 0.10\text{g}/\text{kg}$ 。长毒试验表明,本品对完整皮肤和破损皮肤家兔连续外擦四周,剂量相当人用量的 30 与 100 倍,结果体重、饮食、二便、毛发、脏器系数、血常规、肝肾功能、病理组织学检查等均正常,与空白组比较均无显著差异, $P>0.05$ 。

文献报道^[6]大鼠 iv 土的宁的 $\text{LD}_{50}=0.58\text{mg}/\text{kg}$,按体表面积折算到家兔 iv 的 $\text{LD}_{50}=0.145\text{mg}/\text{kg}$,按家兔含血液 8% 计,即 LD_{50} 时家兔每 mL 血液含土的宁为 $1.81\mu\text{g}$,相当于

高剂量组土的宁透皮吸收量($32.44\text{ng}/\text{mL}$)的 55.8 倍。一般认为 LD_{50} 的 $1/10\sim 50$ 量是安全的,而高剂量组(相当临床应用 60 倍)仅为 LD_{50} 的 55.8 分之一。

结论:临床用量(含生药 13.783%)的伤痛外搽酊外搽,不致于引起显著毒性反应,也不会因外涂透皮吸收而中毒,故本品外用是安全的。

注:血液中土的宁与乌头碱由湖南省中医药研究院省重点实验室测定。

参考文献

- 1 王建新,郭力,李令媛.如意金巴布剂透皮吸收研究,中成药,1996;20(7):3
- 2 姜舜尧,金瓯,田经九.毛细管带电泳测定伸筋胶囊中土的宁和马钱子碱的含量.中草药,1999,30(5):341
- 3 卫生部药政局.中药新药研究指南,1994
- 4 Zong Y Y, Che C t. Determination of strychnine and brucine by capillary zone electrophoresis. Planta Med, 1995, 61: 456
- 5 孙爱民,陈德华,毕培曦.高效毛细管电泳法测定中草药川乌、草乌中乌头碱的含量.色谱,1999,17(1):67
- 6 国家医药管理局中草药情报中心站.植物药有效成分手册,北京:人民卫生出版社,1986,1002

收稿日期:2000-09-05