

栀子环烯醚萜苷鼻腔给药的吸收特性

杨军宣¹, 张海燕², 宋伟², 赵成城³, 卢乾², 杨明² (1.重庆医科大学中医药学院, 重庆 400016; 2.江西中医学院现代中药制剂教育部重点实验室, 南昌 330004; 3.成都中医药大学药学院, 成都 611137)

摘要: 目的 研究栀子环烯醚萜苷类成分鼻腔给药的吸收特性, 为其鼻腔给药制剂设计提供依据。方法 采用 Franz 扩散池, 选用新鲜猪鼻黏膜为渗透屏障, 以栀子苷为测定指标, HPLC 测定含量, 进行渗透试验; 采用大鼠鼻腔循环灌流实验, 以 PBS 溶液(pH7.4)作为鼻腔循环液, HPLC 测定栀子苷, 进行在体鼻黏膜吸收试验。结果 栀子苷表观渗透系数 P_{app} 为 $(2.01 \pm 0.23) \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$; 药物稳态流量 J_{ss} 为 $(1.61 \pm 0.18) \times 10^{-4} \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 透黏膜扩散属于以膜两侧浓度差为动力的被动扩散。栀子苷大鼠在体鼻黏膜吸收动力学方程 $\ln C = 1.1657 - 0.0016t$, $r = 0.9914$, $k = (1.6 \pm 0.021) \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ 。

结论 栀子环烯醚萜苷可经鼻吸收, 可制成经鼻给药的新制剂用于脑部疾病的防治。

关键词: 栀子环烯醚萜苷; 栀子苷; 鼻腔给药; 鼻腔循环灌流实验

中图分类号: R943

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2013)06-0624-04

Absorption Characteristics of Nasal Drug Delivery of Gardenia Iridoid Glycoside

YANG Junxuan¹, ZHANG Haiyan², SONG Wei², ZHAO Chengcheng³, LU Qian², YANG Ming² (1.TCM College of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; 2.Key Laboratory of Modern Preparation of TCM, Ministry of Education, Jiangxi University of TCM, Nanchang 330004, China; 3.College of Pharmacy, Chengdu University of TCM, Chengdu 611137, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the absorption characteristics of a nasal drug delivery of gardenia iridoid glycoside, so as to provide some technical consults of its nasal drug delivery system. **METHODS** Using Franz diffusion cell, the fresh nasal mucosa of pig was used for permeability barrier, the geniposide was determined by HPLC as indexes. Using medicated PBS(pH=7.4) for nasal liquid circulation, the geniposide was determined by HPLC with using rat nasal circulatory perfusion experiments(*in situ*). **RESULTS** The apparent permeability coefficient (P_{app}) of geniposide was $(2.01 \pm 0.23) \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, the steady state flow (J_{ss}) of geniposide was $(1.61 \pm 0.18) \times 10^{-4} \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, the diffusion through mucosa was a passive diffusion with concentration difference of both mucosal sides. The absorption kinetics equation of geniposide in rat nasal mucosa(*in vivo*) was $\ln C = 1.1657 - 0.0016t$, $r = 0.9914$, $k = (1.6 \pm 0.021) \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$. **CONCLUSION** Gardenia iridoid glycoside can be absorbed through nasal mucosa, which can be made into new nasal preparations for the prevention and treatment of brain diseases.

KEY WORDS: gardenia iridoid glycoside; geniposide; nasal drug delivery; nasal circulatory perfusion test

栀子环烯醚萜苷为茜草科植物栀子 *Gardenia jasminoides* Ellis 的主要有效成分^[1]。栀子具有泻火除烦, 凉血、止血、清热解毒、清利湿热等功效; 清三焦之火, 导热下行, 可用于血热出血证, 既能清解血分之热, 又有止血之功; 可用于血热妄行所致的多种出血证, 亦与利尿通淋药配伍, 用于湿热淋证。近年来对栀子及其有效成分的研究表明, 其在消化系统、心脑血管系统^[2]、中枢神经系统等方面具有广泛作用, 临床亦开始尝试用于脑血管疾病的防治^[3]。

由于鼻黏膜在解剖生理上与脑存在独特的天然联系, 鼻腔给药是近年来研究最多的给药途径之一, 不仅具有药物吸收迅速, 无肝首过效应, 给药方便等优点, 而且还具有向脑内递药(脑靶向)

的特性^[4], 故鼻黏膜给药对脑部疾病具有潜在的治疗优势。对比研究栀子苷不同给药途径的药效(另文发表), 结果表明静脉注射给药疗效最好, 鼻腔给药效果与肌肉注射相当, 口服最差。为探讨栀子环烯醚萜苷类成分经鼻给药治疗脑血管疾病的可行性, 本实验对栀子环烯醚萜苷经鼻给药的吸收特性进行了研究。

1 材料和仪器

栀子苷对照品(中国药品生物制品检定所, 批号: 110749-200714, 含量测定用); 栀子环烯醚萜苷提取物(自制, 批号: 20100801, 总苷含量 50% 以上); 乙腈为色谱纯; 其他试剂均为分析纯; 水为重蒸馏水。

Agilent-1200 液相色谱仪(美国 Agilent 公司),

基金项目: 国家“十一五”支撑计划重大新药创制(2009ZX09103-393)

作者简介: 杨军宣, 男, 博士, 工程师 Tel: (023)65712064 E-mail: yjxhawk@sina.com

UVD 检测器, 安捷伦色谱数据工作站; Phenomenex Luna C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); FA1104 型上皿电子天平(上海精科仪器厂); BP211D 电子天平(德国 Sartorius); Franz 扩散池(青岛荣升必达公司); TT-6D 药物透皮扩散试验仪(天津市正通科技有限公司); HF6A 型多头磁力加热搅拌器(常州国华电器有限公司); HL-2S 恒流泵(上海青浦沪西仪器厂); 超声清洗器(上海必能信超声有限公司); RE-53C 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂); SHZ-DIII 型循环水式真空泵(浙江黄岩求精真空泵厂)。

SD 大鼠, ♂, 体质量(300±20)g, 江西医学院试验动物中心, 实验动物许可证号: SCXK(赣)2006-0001, 合格证号: 021-9602。猪鼻黏膜: 自取于南昌市湾里区岗下村屠宰场。

2 方法与结果

2.1 栀子苷的 HPLC 测定方法的建立^[5]

2.1.1 色谱条件及系统适应性 色谱柱: Phenomenex Luna C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-水(15:85); 流速 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长 238 nm, 柱温为 25℃, 进样量 10 μL; 理论板数按栀子苷峰计算应≥1500。

2.1.2 专属性考察 精密称取栀子苷对照品适量, 加甲醇溶解制成 50 μg·mL⁻¹ 的溶液(实际 50.9 μg·mL⁻¹)。膜扩散试验接受室为 PBS 溶液(pH 7.4), 以 PBS 溶液为阴性对照, 进行专属性考察。在 200~400 nm 内进行光谱扫描, 结果对照品溶液和供试品溶液(取接受室样品液 1 mL, 加甲醇稀释至 5 mL, 振摇 2 min, 1 000 r·min⁻¹ 离心处理 10 min, 0.45 μm 滤过, 滤液作为供试品溶液)在 238 nm 波长处有最大吸收, 阴性对照无吸收。

取栀子苷对照品溶液、供试品溶液和阴性样品溶液各 10 μL, 进样。结果阴性样品溶液在栀子苷色谱峰相应位置上无色谱峰出现, 表明阴性无干扰。结果见图 1。

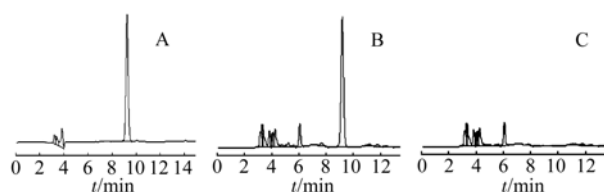


图 1 HPLC 色谱图

A-对照品溶液; B-供试品溶液; C-阴性样品对照溶液

Fig 1 HPLC chromatograms

A-standard solution; B-sample solution; C-negative sample solution

2.1.3 标准曲线的制备 精密称取栀子苷对照品适量, 加甲醇溶解制成 50 μg·mL⁻¹ 的溶液(实际 50.9 μg·mL⁻¹), 分别取对照品溶液 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20 μL 进样, 记录色谱图, 以栀子苷进样量 X(μg)为横坐标, 峰面积 Y(A)为纵坐标, 作图并进行线性回归, 得到回归方程为: $Y=1\,350.2X+6.892\,5$, $r=0.999\,8$ 。结果表明, 栀子苷的进样量在 0.101 8~1.018 μg 内线性关系良好。

2.1.4 重复性试验 精密量取样品溶液 1 mL, 共 6 份, 分别加甲醇稀释至 5 mL, 再 0.45 μm 滤过, 分别进样 10 μL 测定, 记录峰面积, 计算 RSD 值。结果 RSD=1.83%。

2.1.5 稳定性试验 对对照品溶液的稳定性进行考察, 分别在 0, 0.5, 1, 2, 4, 8 h 进样测定, 结果 RSD=1.69%。

2.1.6 回收率试验 精密称取 6 份一定量栀子苷对照品, 加入渗透液中, 制备供试品溶液, 进样测定, 结果栀子苷的平均回收率为 99.19%, RSD 为 1.91%。

2.2 动物离体鼻黏膜体外渗透性实验^[6]

2.2.1 动物鼻黏膜的剥离 把宰杀动物(猪)的鼻子取下, 切开鼻腔, 暴露出鼻中隔及两侧鼻甲骨, 用一个圆头的细玻璃棒及镊子将覆盖在其上的鼻腔薄膜非常小心地慢慢剥离。用生理盐水洗净薄膜上残留的血迹, 滤纸吸干, 平铺于两层铝箔之间, 冰箱冷藏备用。

2.2.2 Franz 扩散池的安装与操作 采用 Franz 渗透扩散装置, 有效扩散面积为 0.64 cm², 接受室体为 6.0 mL。接受室内加入电磁搅拌子和 PBS 溶液(pH 7.4), 将新鲜离体猪的嗅黏膜黏膜层向上固定在扩散室和供给室之间。Franz 扩散池安装完毕后, 置于(32±0.5)℃, 200 r·min⁻¹ 的恒温恒速透皮扩散试验仪中, 平衡 20 min。接受室加入 4 mL PBS 溶液, 用定量加液器加入 400 μL 栀子环烯醚萜苷溶液均匀覆盖嗅黏膜, 分别于 5, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240 min 于接受室内定量取样 1 mL, 每次取样后补加 PBS 溶液 1 mL, 使接受室中液体体积保持恒定。取出的样品用甲醇适当稀释, 离心处理(10 000 r·min⁻¹, 10 min), 再 0.45 μm 滤过, 用 HPLC 测定栀子苷的峰面积 A。

2.2.3 数据处理 用 HPLC 测定栀子苷的峰面积 A, 代入标准曲线方程中, 换算出相应药物浓度 C(μg·mL⁻¹), 计算药物透过鼻黏膜的累积渗透量

Q 、表观渗透系数 P_{app} 、药物稳态流量 J_{ss} 等。绘制累计释药曲线, 考察药物透膜的动力学方程。按下式计算累积渗透量 Q 。

$$Q = V_0 \times C_n + V_i \sum_{i=1}^{n-1} C_i$$

上述公式中, Q : 累积渗透量(μg); V_0 : 接收液体积(mL); C_n : 第 n 次(即最后一次)取样时测得的接受液中药物浓度($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$); V_i : 每次的取样体积(mL); C_i : 第 $n-1$ 次测得的接受液中药物浓度($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$);

以离体鼻黏膜累积渗透量 Q 与渗透时间 t 拟合方程, 以下列公式计算药物的表观渗透系数(P_{app} , $\text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)和稳态流量(J_{ss} , $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$):

$$P_{app} = \frac{dQ/dt}{C_0 \times A \times 60} ; J_{ss} = \frac{dQ}{dt} \times \frac{1}{A \times 60}$$

C_0 为供药池初始药物浓度; A 为有效透过面积; dQ/dt 可由累积透过量-时间曲线稳态部分的斜率求得。

2.2.4 实验结果 取用离体猪鼻黏膜, 按上述试验方法操作, 测得各个时间点单位面积的的药物累计渗透情况, 绘制累计透过曲线图, 结果见图 2。

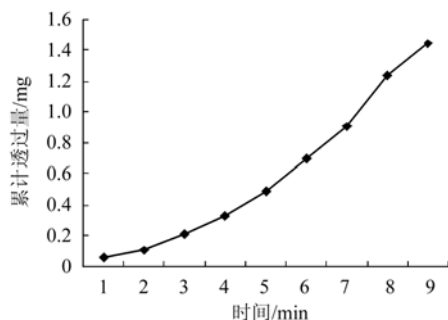


图 2 累计透过曲线图

Fig 2 Accumulated infiltration graph

对数据分别用零级动力学方程、Higuchi 方程和一级动力学方程等数学模型拟合, 结果以一级动力学方程拟合度最佳。拟合方程为: $F(t) = 0.0062t + 0.0643$, $r = 0.9903$ 。分别计算表观渗透系数 P_{app} 和药物稳态流量 J_{ss} 等参数, 结果 $P_{app} = (2.01 \pm 0.23) \times 10^{-5} \text{ cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$; $J_{ss} = (1.61 \pm 0.18) \times 10^{-4} \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 。结果表明药物的透猪鼻黏膜扩散属于以膜两侧浓度差为动力的被动扩散。

2.3 大鼠在体鼻黏膜吸收实验

2.3.1 大鼠鼻黏膜洗出液的收集 取 50 mL PBS 溶液(pH 7.4), 按大鼠在体鼻循环法操作, 流速 $2.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 持续循环 30 min, 即得大鼠鼻腔洗

出液。将洗出液在 37°C 恒温水浴中平衡 5 min, 备用。

2.3.2 栀子苷在洗出液中的稳定性考察 精密称取栀子苷对照品适量, 用大鼠鼻腔洗出液配制得 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液, 在 37°C 恒温水浴中孵育, 在各规定时间点(0, 4, 8, 12, 24 h)取样, 测定。结果表明, 栀子苷在大鼠鼻腔洗出液中较稳定, 24 h 内进行循环灌流实验, 不影响残余药液的测定。

2.3.3 大鼠在体鼻循环法^[7] 选择体质量(300 ± 20)g 的 δ 大鼠, 乌拉坦($1.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)麻醉, 固定在自制的手术台上, 切开颈部皮肤, 暴露气管和食管, 在气管上做一个“T”型切口, 用一根聚乙烯管进行气管插管, 保持呼吸通畅; 在食管上做一个小开口, 另取一根粗细适中的硅胶管向咽部进行食管插管, 直至鼻腔后部有阻力感为宜, 结扎固定; 用医用粘合剂将鼻腭通道封闭, 防止液体从口腔露出; 将硅胶管另一端与储液池相连(储液池需置于 37°C 恒温水浴中), 用恒流泵将药液输入鼻腔, 药液再由鼻孔滴出后进入储液池, 反复循环。定时(0, 10, 20, 30, 40, 60, 90, 120, 180 min)取样测定循环液中药物浓度, 以确定药物吸收量和计算吸收速率常数。试验装置如图 3 所示。

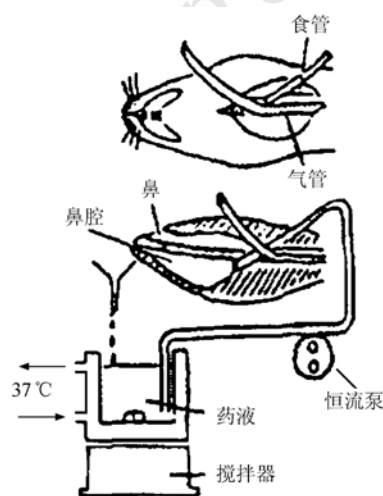


图 3 在体循环示意图

Fig 3 Circulation sketch map in situ

2.3.4 数据处理 不同时间点的药物以一级动力学方程进行分析, 以剩余药物浓度的对数($\ln C$)对时间 t 进行回归分析, 斜率 k 即为吸收速率常数。 k 值的大小可反映鼻黏膜对药物的吸收情况。计算公式为: $\ln C = \ln C_0 - kt$, 式中, C : 剩余的药物浓度($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$); C_0 : 原有的药物浓度($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$); k : 吸收速率常数(min^{-1})。

2.4.5 在体鼻黏膜吸收实验操作及结果 选择大鼠, 试验操作插管后, 用蠕动泵将药液输入鼻腔, 药液再由鼻孔滴出后进入储液池, 药液体积 5 mL, 循环速度 $2.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。反复循环, 定时(0, 10, 20, 30, 40, 60, 90, 120, 180 min)取样 100 μL , 同时补加等量空白 PBS 液。测定循环液中药物浓度, 不同时间点的药物以一级动力学方程进行分析。测定结果见表 1。

表 1 大鼠在体鼻黏膜吸收试验测定结果($n=3$)

Tab 1 Determination results of geniposide through nasal mucosa of rat *in situ*($n=3$)

时间/min	累计透过量/ μg
0	0
10	15.6 ± 1.02
20	24.5 ± 1.73
30	61.8 ± 2.31
40	76.0 ± 1.89
60	112.0 ± 3.26
90	135.0 ± 5.11
120	180.6 ± 3.23
180	198.3 ± 4.01

以一级动力学方程进行分析, $\ln C = 1.1657 - 0.0016t$, $r = 0.9914$, 吸收速率常数 $k = (1.6 \pm 0.021) \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ 。

3 讨论

目前, 鼻黏膜给药研究方法主要有体外法和体内法, 体外法又包括离体法、大鼠在体鼻循环法(*in situ* nasal recirculation method)和大鼠在体鼻滞留法(*in situ* nasal deposit method)。一般情况下, 鼻循环灌流过程中鼻腔对水分的分泌和重吸收可忽略不计^[8]。试验时应注意: ①由于灌流液的渗透压可能会影响药物的吸收, 因此亦可采用等渗的生理盐水来配制灌流液; ②灌流液的流速对药物的吸收影响也较大, 流速过小不能使药液充分循环, 过大则可能会破坏鼻黏膜表面的正常生理结构, 本实验选择流速为 $2.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 此流速也是大多数文献报道中的最佳流速; ③由于鼻腔容积有限, 循环液体积越大, 药物的浓度变化也就越小, 选择了灌流体积为 5 mL, 可以保证试验的准确性; ④试验中发现, 在进行鼻灌流试验时, 大鼠会吸收灌流液中的水分, 导致灌流液体积的减少, 引起药物浓度的升高。由于水分的吸收速度

与药物速度接近, 在测定时, 药物的浓度甚至会出现越变越大的现象。如果用传统方法, 以药物浓度变化来计算药物的吸收, 可能会得出药物在鼻腔无吸收的结论。此时可采用体积校正法计算循环液中的药物总量^[9]; ⑥进行在体吸收试验时, 环境因素和动物因素对试验结果影响显著。研究鼻腔内药物吸收机制; 主要采用兔、犬、羊和猪等鼻黏膜, 但渗透系数不同, 可能与各动物黏膜组织结构不同有关。因此选择动物模型, 应考虑种属差异。

鼻黏膜中药物的吸收主要为被动扩散, 与其亲水亲油性质密切相关。脂溶性药物易被吸收, 但鼻黏膜除亲脂性通道外, 还存在亲水性通道^[10]。本研究表明栀子苷的透猪嗅黏膜扩散属于以膜两侧浓度差为动力的被动扩散, 膜孔扩散可能是其经鼻吸收主要途径。

REFERENCES

- [1] PEI C Y, CAI Y, SONG J, et al. Determination of iridoid glycoside in *Gardenia jasminoides* from 10 batches [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药理学), 2011, 28(13): 1343-1345.
- [2] TANG P P, BAI M, YIN J T, et al. External curative effect of gardenia powder with vinegar in rat model of blood stasis [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药理学), 2013, 30(4): 348-352.
- [3] YANG J X, ZHANG H Y, ZHAO C C, et al. Progress on studies of mechanism of *Gardenia iridoid* glycosides for cerebral ischemic injury [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*(中国实验方剂学), 2010, 16(6): 325-329.
- [4] JIANG X G. Intranasal drug delivery [J]. *Chin J New drugs*(中国新药杂志), 2003, 12(11): 902-905.
- [5] Ch.P(2010)Vol I (中国药典 2010 年版. 一部) [S]. 2010: 231
- [6] XU R C. Distribution of baicalin phospholipids complex into brain following intranasal administration [D]. *Chengdu University of TCM*(成都中医药大学), 2008.
- [7] JIANG X G, LU X, CUI J B, et al. Study on octanol-water partition coefficient and nasal drug absorption [J]. *Acta Pharm Sin.* 1997, 32(6): 458-460.
- [8] OLIVIER J C, DJILANI M, FAHMY S, et al. In situ nasal absorption of midazolam in rats [J]. *Int J Pharm*, 2001, 213(1/2): 187-192
- [9] DU S Y, LU Y, YAO Z L, et al. Effect of components in Xingnaojing on the rat nasal absorption of geniposide in gardenia extract [J]. *Chin J Exp Med Form*(中国实验方剂学杂志), 2012, 18(4): 146-150.
- [10] DUCHATEAU G, ZUIDEMA J, ALBERS W M, et al. Nasal absorption of alprenolol and metoprolol [J]. *Int J Pharm*, 1986, 34(1/2): 131-136.

收稿日期: 2012-10-16