



基于单向灌流法的艾片大鼠在体鼻黏膜吸收研究

宋道^{1,2}, 杜守颖^{1*}, 陆洋¹, 马勇¹, 陈晓兰¹, 王玥¹, 张慧贤¹

(1. 北京中医药大学 中药学院, 北京 100102;

2. 陕西中医学院 药学院, 西安 陕西 712046)

[摘要] 目的:研究艾片的大鼠在体鼻黏膜吸收影响因素。方法:运用单向灌流模型、采用GC对艾片中有效成分龙脑进行检测,分别研究药物质量浓度、灌流速度、pH对艾片吸收的影响。结果:灌流速度对艾片的吸收速率常数(K_a)有显著性影响;药物质量浓度和pH对 K_a 无显著性影响。结论:艾片的鼻黏膜吸收良好,艾片的吸收速率不受药物质量浓度的影响,其在鼻腔按照一级被动方程进行吸收。

[关键词] 在体鼻吸收;艾片;鼻单向灌流法

大鼠在体鼻循环实验法是评价药物经鼻黏膜吸收情况的经典方法,因而,在鼻腔给药制剂研究中具有广泛的应用^[1]。艾片为菊科植物艾纳 *Blum balsamifera*(L.) D. C. 的新鲜叶经提取加工制成的结晶,其具清香气,味辛、凉,具有开窍醒神,清热止痛的功效。在临床上的应用极为广泛,特别是在心脑血管疾病中的应用尤引人关注,发挥开窍和佐使引经作用。因此,本实验以经典的大鼠在体鼻循环实验评价艾片在鼻腔中的吸收情况。但是,在采用此法研究艾片的大鼠鼻腔吸收情况时却发现实验中所采用的导管对艾片有很强的吸附作用,2 h 可达60%左右,那么如何评价艾片的鼻黏膜吸收情况,以及像艾片一样采用在体鼻循环实验研究时有吸附现象的药物,就成为函待解决的迫切问题。基于此,本实验采用大鼠鼻单向灌流法研究艾片鼻黏膜吸收情况^[2],该方法稳定可行,不但可作为评价艾片的鼻腔吸收的研究方法,也可为诸如此类情况药物的大鼠鼻黏膜吸收研究提供一定的方法和思路。

1 材料

蠕动泵(保定兰格恒流泵有限公司), Agilent7890A 气相色谱仪, FID 检测器; CX-100 型超声

波清洗器(北京医疗设备厂); BS110S 型电子分析天平(北京赛多利斯公司)。

龙脑对照品(中国药品生物制品检定所,批号110881-200706); 艾片; 十八烷; 乙酸乙酯分析纯(北京化工厂); 娃哈哈纯净水(杭州娃哈哈集团); 其他试剂均为分析纯。

SD 大鼠, 雄性, 体重 250 ~ 300 g, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 动物合格证号 SCXK(京)2006-0009。

2 方法与结果

2.1 鼻单向灌流法

大鼠腹腔注射 10% 的水合氯醛 ($5.2 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$), 仰卧固定于平板上, 在颈部做切口, 暴露气管和食管。取聚乙烯管 2 支, 一支插入气管, 另一支的一端插入食管, 直至鼻腔后部, 用胶黏剂将鼻腔与口腔的鼻腭通道封闭, 以防药液从口腔中流失, 管子的另一端与装有药液的管连接在一起, 蠕动泵使药液经鼻腔灌流, 灌流液流速 $0.2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。分别于 5, 10, 20, 30, 45, 60, 90, 120 min 在大鼠鼻腔出口处用一已知质量的小瓶收集 1 次(同时迅速更换下一个收集液小瓶), 称量此时收集液小瓶的质量。实验结束后, 取各时间点的收集液 0.4 mL, 置 1.5 mL 离心管中, 加 0.4 mL 内标液 ($103.094 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 十八烷), 涡旋 3 min, 高速离心 ($10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$) 10 min, 分离上清液(有机相层) 200 μL , 吸取 1 μL 注入气相色谱仪。计算相应时间的艾片质量浓度 C , 采用重量法按下式计算药物吸收速率常数 (K_a)^[2]。

$$K_a = (1 - \frac{C_{\text{out}} \cdot Q_{\text{out}}}{C_{\text{in}} \cdot Q_{\text{in}}}) \frac{Q}{V}$$

[稿件编号] 20110319005

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2009ZX09502-008, 2009ZX09308-003); 国家自然科学基金面上项目(81073057); 教育部博士点基金项目(20090013110007)

[通信作者] * 杜守颖, 教授, 博士生导师, 研究方向中药新剂型与制剂关键新技术, Tel: (010)84738615, E-mail: dushouying@263.net

[作者简介] 宋道, 博士研究生, 主要从事中药新剂型与新技术研究, E-mail: songxiao1999@sohu.com

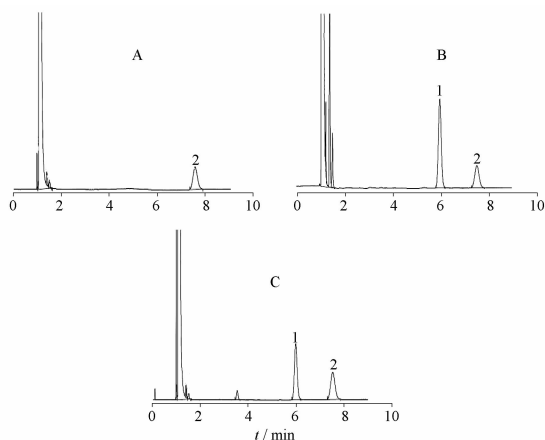


式中, Q_{in} 和 Q_{out} 分别为灌入和收集的供试液体积(假定供试液密度为 $1.0 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 根据测得质量计算体积); 为灌流速度; C_{in} 和 C_{out} 分别为进口和出口液中的药物浓度; Q 为灌流速度; V 为大鼠鼻腔的体积。

2.2 GC 测定艾片

2.2.1 色谱条件

Agilent - DB-WAX 毛细管色谱柱 ($1.0 \mu\text{m} \times 0.53 \text{ mm} \times 30.0 \text{ m}$); 载气氮气; 进样口温度 $250 \text{ }^\circ\text{C}$, 检测器温度 $280 \text{ }^\circ\text{C}$; 氮气流速 $6 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, $140 \text{ }^\circ\text{C}$ 维持 9 min ; 进样 $1 \mu\text{L}$, 分流比 $20:1$ 。龙脑的相对保留时间约为 5.9 min 。接收液其他物质对艾片测定无干扰见图 1。



1. 龙脑; 2. 十八烷。

图1 空白内标(A)、对照品(B)和供试品(C)的气相色谱图

2.2.2 标准曲线的制备

精密称定龙脑对照品适量, 加无水乙醇适量溶解, 用 2% 吐温生理盐水配制质量浓度为 $23.504, 117.52, 235.04, 470.08, 705.12, 940.16 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液。精密称取十八烷适量, 用乙酸乙酯定容, 作为内标液。精密移取不同浓度的对照液各 0.4 mL , 置 1.5 mL 离心管中, 其余操作依照 2.1 项下样品的制备方法进行。计算相应时间的龙脑质量浓度 C 。以龙脑的浓度为横坐标, 龙脑与内标峰面积的比值为纵坐标, 进行线性回归, 回归方程为 $A = 7.87 C + 0.0055, r = 0.9998$ 。龙脑质量浓度 (C) 在 $23.504 \sim 940.16 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 线性关系良好。

取低、中、高浓度的龙脑对照溶液, 按上述色谱条件各连续进样 6 次, 记录峰面积, 计算 RSD 分别为 $0.80\%, 1.5\%, 0.18\%$ 。

用 2% 聚氧乙烯脱水山梨醇单油酸酯 (吐温 80) 生理盐水配制不同质量浓度 ($47.008, 188.032, 564.096 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 的龙脑对照溶液, 分别各取 0.4 mL , 依 2.1 项下样品的制备方法进行, 按上述色谱条件进样, 测定, 计算龙脑低、中、高 3 个浓度回收率分别为 $102.9\%, 103.3\%, 97.25\%$ 。

取低、中、高浓度的龙脑对照液, 连续 3 d 进样, 不同浓度龙脑对照液的 RSD 分别为 $3.3\%, 0.44\%, 1.4\%$ 。

2.3 鼻腔分泌液对艾片稳定性的研究

取 2% 吐温 80 生理盐水液适量, 按大鼠鼻单向灌流法操作, 流速 $0.2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 持续 30 min , 即得大鼠鼻腔洗出液。将洗出液放入带塞试管中, 在 $37 \text{ }^\circ\text{C}$, 恒温水浴中平衡 5 min , 用大鼠鼻腔洗出液配制成 $197.12 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的艾片溶液, 在 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 恒温水浴中孵育, 在 $0, 2, 4, 6, 8 \text{ h}$ 分别取样 0.4 mL , 其余操作依 2.1 项下的实验步骤进行, 计算 RSD 0.6% 。结果表明, 8 h 内艾片在鼻腔分泌液中稳定性良好。

2.4 不同质量浓度艾片鼻黏膜的吸收

配制不同质量浓度的 ($98.56, 492.8, 985.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 艾片药液作为鼻单向灌流液, 其余操作同 2.1 项下的方法, 以考察不同浓度的艾片吸收速率常数, 结果见表 1。

表1 不同浓度的艾片吸收速率常数 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	K_a/min^{-1}	$t_{1/2}/\text{min}$
98.56	0.60 ± 0.010	1.14 ± 0.03
492.8	0.59 ± 0.011	1.16 ± 0.02
985.6	0.61 ± 0.013	1.15 ± 0.02

结果显示, 对不同质量浓度艾片吸收速率常数进行单因素方差分析, 结果在不同浓度的条件下, 艾片的吸收速率常数无任何显著性差异。推测其在鼻腔可能按照一级被动方程进行吸收。

2.5 不同流速下艾片的鼻黏膜吸收

以质量浓度为 $98.56 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的艾片药液做为供试液(后续实验都以此做为供试液), 设置蠕动泵以不同灌流速度 ($0.1, 0.2, 0.3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$), 其余操作同 2.1 项下的方法, 以考察不同灌流速度下艾片的鼻黏膜吸收情况, 结果见表 2。

结果显示, 对不同灌流速度下艾片的吸收速率常数进行单因素方差分析, 结果灌流速度为 0.1 mL



· min⁻¹时艾片的吸收速率常数与0.2, 0.3 mL · min⁻¹时艾片的吸收速率常数有显著性的差异, 而灌流速度为0.2, 0.3 mL · min⁻¹时艾片的吸收速率常数经单因素方差分析无显著性差异, 本实验最终确定艾片的大鼠在体鼻单向灌流实验的流速为0.2 mL · min⁻¹。

表2 不同灌流速度下艾片的鼻黏膜吸收情况($\bar{x} \pm s, n=6$)

灌流速度/mL · min ⁻¹	K _a /min ⁻¹	t _{1/2} /min
0.1	0.30 ± 0.01	2.31 ± 0.09
0.2	0.61 ± 0.01	1.14 ± 0.03
0.3	0.60 ± 0.01	1.15 ± 0.02

2.6 不同 pH 条件下艾片的鼻黏膜吸收

用2%吐温80生理盐水配制pH 5的磷酸盐缓冲液(按照《中国药典》2010年版一部附录项下的方法进行), 分别以0.1 mol · L⁻¹ NaOH和0.1 mol · L⁻¹ 盐酸溶液调节pH为5.5, 6.0, 7.0, 7.4, 得到不同pH液作为鼻灌流液, 其余操作同2.1项下的方法, 以考察不同pH灌流液下艾片的鼻黏膜吸收, 结果见表3。

表3 不同pH灌流液下艾片鼻黏膜吸收($\bar{x} \pm s, n=6$)

pH	K _a /min ⁻¹	t _{1/2} /min
5.5	0.61 ± 0.01	1.14 ± 0.02
6.0	0.60 ± 0.01	1.15 ± 0.02
7.0	0.61 ± 0.02	1.14 ± 0.02
7.4	0.60 ± 0.03	1.15 ± 0.03

对表3进行单因素方差分析, 在鼻腔条件下pH范围内及生理条件pH下艾片的吸收速率常数无显著性差异。说明艾片可以在鼻腔黏膜中稳定的吸收。

3 讨论

药物的脂溶性^[3]是影响鼻黏膜吸收的重要因素, 而药物的脂溶性取决于它本身的结构及所处条

件下的分子型比例。实验结果表明, 艾片的药物浓度不影响其吸收速率常数, 其在鼻黏膜吸收符合一级动力学方程, 其在鼻腔粘液的pH(5.5~6.0)和正常生理条件下的pH中吸收稳定, 且吸收速率常数无显著性差异, 而且很快被鼻腔吸收, 其吸收半衰期很快, 大约在1 min左右。另外, 本实验在不同灌流速度下考察了艾片的吸收速率常数, 结果发现速灌流速度为0.1 mL · min⁻¹时艾片的吸收速率常数与0.2, 0.3 mL · min⁻¹时艾片的吸收速率常数有显著性的差异, 而灌流速度为0.2, 0.3 mL · min⁻¹时艾片的吸收速率常数经单因素方差分析无显著性差异, 考虑到速度过大会对鼻黏膜有损伤, 造成实验误差, 本实验最终确定艾片的大鼠在体鼻单向灌流实验的流速为0.2 mL · min⁻¹。

最后, 本实验采用体积矫正的方法测定了大鼠的鼻腔体积, 蠕动泵的管一端插入盛有灌流液的量筒中, 另外一端联接在插入大鼠食管的聚乙烯管中, 启动蠕动泵, 以0.2 mL · min⁻¹的流速, 进行灌流, 当灌流液充满聚乙烯管时, 停止蠕动泵, 记录下来量筒中的体积, 而后继续启动蠕动泵, 当灌流液从大鼠鼻腔第1滴即将流出时, 停止蠕动泵, 记录下量筒的体积, 前后量筒体积之差既是大鼠的鼻腔体积, 即0.1 mL。

总之, 本实验采用鼻单向灌流方法研究了艾片的大鼠在体鼻黏膜吸收情况, 该方法稳定, 方便, 可为诸如艾片等在大鼠在体鼻循环实验有吸附的药物研究提供一定的参考。

[参考文献]

[1] 晏亦林, 周莉玲, 叶勇, 等. 磷酸川芎嗪脂质体大鼠在体鼻黏膜吸收研究[J]. 中药新药与临床药理, 2007, 18(5):406.

[2] Chen Xiaolan, Lu Yang, Du Shouying, et al. *In situ* and *in vivo* study of nasal absorption of paeonol in rats[J]. Int J Mol Sci, 2010, 11:4882.

[3] 蒋新国. 药物的鼻黏膜吸收[J]. 中国新药杂志, 2003, 12(11):903.



Study on rat nasal absorption *in situ* of borneol based on single pass perfusion method

SONG Xiao^{1,2}, DU Shouying^{1*}, LU Yang¹, MA Yong¹, CHEN Xiaolan¹, WANG Yue¹, ZHANG Huixian¹

(1. School of Chinese Pharmacy, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China;

2. School of Pharmacy, Shannxi University of Traditional Chinese Medicine, Xi'an 712046, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the absorption characteristic of borneol. **Method:** Using single pass perfusion model, the active ingredient of borneol were detected by GC. The drug concentration, perfusion rate and pH value on the absorption of borneol were studied. **Result:** Perfusion rate on the absorption rate constants (K_a) had significant effects. Drug concentration and pH value on the absorption rate constants had no significant impact. **Conclusion:** the absorption of borneol is good by nasal. The absorption rate constants of borneol have no effected by drug concentration. The absorption of borneol is via a simple diffusion.

[Key words] *in situ* nasal absorption; borneol; single pass nasal perfusion

doi:10.4268/cjcm20111808

[责任编辑 马超一]

书 讯

科学出版社于2011年3月出版了由中国药品生物制品检定所林瑞超教授主编的《中国药材标准名录》。作者在国家食品药品监督管理局的大力支持和全国各省、自治区、直辖市药检所的积极配合下,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,编写了这本权威、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。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、新华书店及医学专业店有售。定价298元。电话:010-64034601,64019031;地址:北京市东黄城根北街16号科学出版社(100717);联系人:温晓萍;请在汇款附言注明所购图书的书名、册数、联系电话、是否要发票等。