

## 草乌甲素 4 种皮肤屏障模型家兔在体透皮吸收对比研究

张培培<sup>1,2)</sup>, 崔佳丽<sup>2)</sup>, 刘红斌<sup>2)</sup>, 唐当柱<sup>1)</sup>, 杨 艳<sup>1)</sup>, 李德光<sup>3)</sup>

(1)昆明卫生职业学院药学院, 云南 昆明 650600; 2)云南白药集团创新研发中心药物安全性评价中心, 云南 昆明 650111; 3)昆明市中医医院骨伤科, 云南 昆明 650051)

**[摘要]** **目的** 对比研究草乌甲素凝胶贴在正常家兔正常皮肤、正常家兔破损皮肤、病理损伤正常皮肤、病理损伤破损皮肤 4 种皮肤屏障模型在体透皮吸收。**方法** 采用肌肉注射 50% 甘油的方法获得病理损伤模型家兔, 采用 1 号砂纸包裹木棒轻轻摩擦皮肤表面至变为浅红的方法制备破损皮肤。4 种皮肤屏障模型经皮给予草乌甲素凝胶贴, 正常皮肤于给药后 1 h、2 h、3 h、4 h、5 h、6 h、8 h、10 h 采血, 破损皮肤于给药后 1 h、2 h、3 h、4 h、5 h、6 h、8 h、10 h、12 h、24 h、36 h 采血, HPLC-MS/MS 检测 4 种模型家兔草乌甲素给药后不同时间点血浆药物浓度, 采用 DAS 3.2.0 计算药代参数, SPSS 23.0 进行组间药代参数统计。**结果** AUC(0-t)、AUC(0-∞)、C<sub>max</sub> 3 个药代参数在 4 种皮肤屏障模型家兔的变化趋势一致, 大小分别为: 正常家兔破损皮肤>病理损伤破损皮肤>病理损伤正常皮肤>正常家兔正常皮肤。皮肤外环境不同对草乌甲素透过率产生较大影响, 破损皮肤透过率明显高于正常皮肤( $P < 0.05$ ); 单纯病理损伤(内伤), 皮肤状态一致, 草乌甲素的吸收、消除的程度和速度均无明显影响( $P > 0.05$ ); 模拟外伤所致正常家兔破损皮肤、内外伤的病理损伤破损皮肤与正常家兔正常皮肤相比, 草乌甲素吸收程度大幅提高、消除能力明显降低( $P < 0.05$ )。**结论** 皮肤角质层的屏障功能是草乌甲素透皮吸收的主要限制因素, 外伤或内外伤状态下, 可能导致草乌甲素在体内蓄积, 影响用药安全。在进行经皮给药制剂试验研究时, 应同时进行正常和模拟外伤所致的破损皮肤或内外伤的病理损伤破损皮肤模型对比研究, 模拟临床肌肉、皮肤受到内外伤的情况下透皮吸收, 将有助于更加全面准确地评价经皮给药制剂药效、药代和毒理特性。

**[关键词]** 草乌甲素; 正常皮肤; 破损皮肤; 病理损伤; 液质联用

**[中图分类号]** R94 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 2095-610X(2024)04-0026-09

## Comparative Study on Transdermal Absorption of Bulleyaconitine A in Four Skin Barrier Models of Rabbits

ZHANG Peipei<sup>1,2)</sup>, CUI Jiali<sup>2)</sup>, LIU Hongbin<sup>2)</sup>, TANG Dangzhu<sup>1)</sup>, YANG Yan<sup>1)</sup>, Li Deguang<sup>3)</sup>

(1) School of Pharmacy, Kunming Health Vocational College, Kunming Yunnan 650500; 2) Innovation and R & D Center/Drug Safety Evaluation Center, Yunnan Bai Yao Group Kunming Yunnan 650111; 3) Dept. of Orthopaedics, Kunming Municipal Hospital of Traditional Chinese Medicine, Kunming Yunnan 650051, China)

**[Abstract]** **Objective** To compare the transdermal absorption of Bulleyaconitine A on normal rabbit intact skin, normal rabbit damaged skin, pathological damaged normal skin, and pathological damaged injured skin barrier models in vivo. **Methods** The rabbit model of pathological injury was obtained by intramuscular injection of 50% glycerol. The damaged skin was prepared by gently rubbing the skin surface with a wooden stick wrapped in No. 1 sandpaper until it turned light red. Four skin barrier models were topically treated with Bulleyaconitine A gel. Blood

**[收稿日期]** 2023-10-06

**[基金项目]** 云南省教育厅科学研究基金资助项目(2022J1874; 2022J1877); 云南省科技厅基础研究计划基金资助项目(202101AZ070001-273)

**[作者简介]** 张培培(1985~), 女, 河南信阳人, 医学硕士, 工程师/副教授, 主要从事体内外药物分析及药效物质基础研究工作。

**[通信作者]** 李德光, E-mail: Ldgdor0301@163.com

samples were collected at various time points after drug administration for normal skin (1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h, 8 h, 10 h) and damaged skin (1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h, 8 h, 10 h, 12 h, 24 h, 36 h). HPLC-MS/MS was used to detect drug concentrations in rabbit models at different time points after Carbenoxolone administration. Drug pharmacokinetic parameters were calculated using DAS 3.2.0, and inter-group pharmacokinetic parameters were statistically analyzed using SPSS 23.0. **Results** The trends of three pharmacokinetic parameters,  $AUC(0-t)$ ,  $AUC(0-\infty)$ , and  $C_{max}$ , in four skin barrier models of rabbits are consistent. They are as follows in size order: intact skin of normal rabbits > damaged skin from pathological injury > intact skin from pathological injury > intact skin of normal rabbits. Different external skin environments have a significant impact on the permeability of Bulleyaconitine A absorption. The permeability of damaged skin is significantly higher than that of normal skin ( $P < 0.05$ ). Pure pathological damage (internal injury), with consistent skin conditions, shows no significant impact on the absorption and elimination of Chuanwu ( $P > 0.05$ ). Compared to intact skin of normal rabbits, damaged skin from simulated external trauma, and damaged skin from internal and external trauma, the absorption of Bulleyaconitine A significantly increases and the elimination capacity significantly decreases ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The barrier function of the stratum corneum is the main limiting factor for Bulleyaconitine A transdermal absorption. Bulleyaconitine A may accumulate in the body under the condition of trauma or internal or external injuries, which may affect drug safety. When conducting experiments on transdermal drug delivery formulations, it is advisable to simultaneously compare normal skin with damaged skin caused by simulated trauma or pathological damage from internal and external injuries. Studying the transdermal absorption under conditions simulating clinical muscle and skin injuries from internal and external trauma will help in a more comprehensive and accurate evaluation of the efficacy, pharmacokinetics, and toxicological properties of transdermal drug delivery formulations.

[ **Key words** ] Bulleyaconitine A; Normal skin; Damaged skin; Pathological injury; HPLC-MS/MS

草乌甲素(Bulleyaconitine A,  $C_{35}H_{49}NO_{10}$ )是从滇西特有乌头属药用植物滇西耧啦(*Aconitum L.bulleyanum* Diels)中分离出来的生物碱, 见图1A。具有抗炎、镇痛及免疫调节作用, 是1种活性极强的镇痛<sup>[1-10]</sup>、抗炎<sup>[11-18]</sup>的现代植物药。临床应用的草乌甲素制剂有片剂、胶囊剂、注射剂<sup>[7, 19]</sup>, 草乌甲素剂量小、药效强, 但是口服后胃肠不良反应较大, 肝脏首过效应强, 注射剂使用时注射部位长时间剧烈疼痛, 透皮贴剂是其比较理想的给药剂型。首先, 透皮贴剂可以维持相当平稳的血药浓度, 显著减少副反应的发生率, 并可在副反应发生时及时中断给药, 大大提高患者用药的安全性; 其次, 透皮贴剂可有效避免首过效应, 提高治疗效果; 再者, 透皮贴剂可以维持长时间释药, 减少用药次数, 特别适合于类风湿性关节炎等慢性疾病的治疗。另外, 草乌甲素针对的疾病多为身体局部疼痛, 而透皮给药<sup>[20-23]</sup>可以作为局部给药方式, 使药物直达患处, 避免全身给药带来的毒副作用。

本试验选择日本大耳白兔作为在体透皮试验动物, 通过破损皮肤模拟临床外伤的皮肤状态、病理损伤模拟临床扭伤等内伤的生理状态, 进行

正常家兔正常皮肤、正常家兔破损皮肤、病理损伤正常皮肤、病理损伤破损皮肤在体透皮试验, 对4种不同皮肤屏障模型家兔应用草乌甲素凝胶贴的药代动力学进行考察, 比较不同皮肤屏障环境用药后透皮吸收的差异, 全面准确评价不同皮肤、生理状态下草乌甲素凝胶贴的应用, 为后期草乌甲素凝胶贴的继续开发应用提供非临床药代数据支持。为经皮给药制剂药理药效试验设计和安全性评价皮肤刺激性试验进行不同模型动物选择比较提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

**1.1.1 实验仪器** Agilent 1200SL液相色谱仪(美国Agilent公司); API 3200 Q-Trap三重四级杆串联质谱(美国AB公司); Analyst 1.5工作站; 十万分之一分析天平(美国Ohaus公司); Allegra 64R高速冷冻台式离心机(美国Beckman公司); XW-80A涡旋混合器(上海精科实业有限公司); MD200氮吹仪(杭州奥盛仪器有限公司); 宠物用电推剪(上海CODOS KP-3000)。

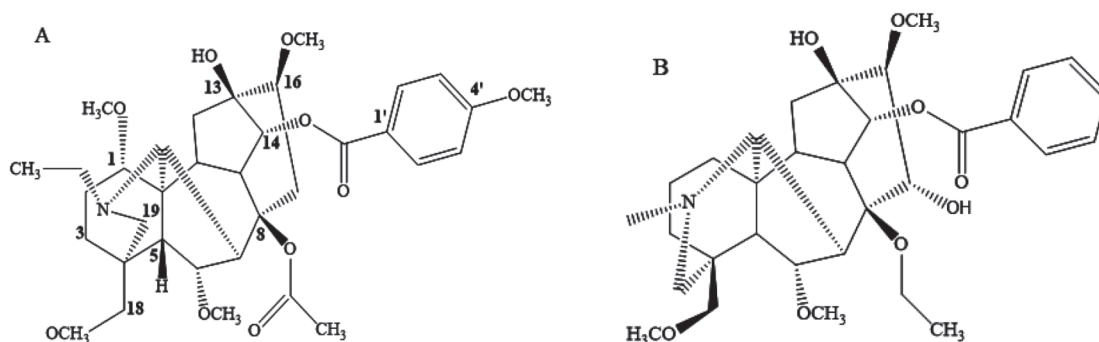


图 1 化学结构式

Fig. 1 Chemical structure

A: 草乌甲素; B: 次乌头碱。

**1.1.2 试药试剂** 草乌甲素凝胶贴(规格: 4 mg/片, 规格为 6.5 cm × 10.0 cm, 云南省药物研究所, 批号: 20150619); 草乌甲素对照品(见图 1A, 纯度 ≥ 98%, 中国药品生物制品检定所, 批号: 100530-200501); 次乌头碱对照品(纯度 ≥ 98%, 北京世纪奥科生物技术有限公司, 批号: MUST-13011706), 见图 1B; 醋酸铵(色谱纯, Adamas analysis reagent Co., LTD, 批号: 22L11-C213); 甲醇(色谱纯, 德国 MERCK 公司, 批号: I584507-113); 甲酸(色谱纯, Adamas analysis reagent Co., LTD, 批号: 10K11-F312)。薇婷脱毛膏(芦荟精华+维生素E)[利洁时家化(中国)有限公司]。

**1.1.3 实验动物** 普通级日本大耳白家兔 24 只, 4 种皮肤屏障模型, 每组 6 只, 雌雄各半, 3~4 月龄, 2.1~2.8 kg, 来源于昆明市艾尼莫实验动物养殖中心, 许可证号: SCXK(滇)K2012-0002。本研究经云南白药集团创新研发中心动物实验伦理委员会审查批准[动(伦)IACUC-2018-32-2]。

## 1.2 研究方法

**1.2.1 试剂配制** (1)草乌甲素储备液及工作液。精密称取草乌甲素样品 5.78 mg, 置于 25 mL 容量瓶中, 加甲醇溶解后定容至刻度, 摇匀, 即得浓度为 0.231 mg/mL 的草乌甲素标准贮备液, 2~8 °C 保存。使用时先取出放至室温。每日根据用量, 用甲醇稀释至所需浓度, 摇匀, 即得草乌甲素标准工作液。

(2)内标储备液(次乌头碱)及工作液。乌头碱样品 4.86 mg, 精密称定, 置于 50 mL 容量瓶中, 加异丙醇: 二氯甲烷=1:1 的混合溶剂溶解后定容至刻度, 摇匀, 即得浓度为 0.0972 mg/mL 的次乌头碱内标贮备液, 2~8 °C 保存。使用时先取出放至室温。用适宜量程的移液器吸取上述内标储

备液 125 μL 至 50 mL 容量瓶中, 加适量异丙醇: 二氯甲烷=1:1 的混合溶剂稀释并定容至刻度, 摇匀, 即得浓度为 243 ng/mL 的次乌头碱内标工作液。

**1.2.2 LC-MS/MS 检测条件** 色谱条件: 色谱柱, Agilent poroshell SB-C<sub>18</sub> 柱(50 mm × 4.6 mm, 2.7 μm); 流动相: 10 mmol/L 醋酸铵 0.1% 甲酸水溶液-甲醇(12: 88, v/v); 流速: 0.5 mL/min; 柱温: 20 °C; 进样量: 5 μL。

质谱条件: ESI 源, POS 模式, MRM 定量。草乌甲素 [M + H]<sup>+</sup>: m/z 644.4 → 584.3, 次乌头碱 [M + H]<sup>+</sup>: m/z 616.3 → 556.2。质谱参数: CUR: 30.0, IS: 5500.0, TEM: 600.00, GS1: 60.00, GS2: 60.00, ihe: ON, CAD: Medium, DP: 72.0, EP: 10.00。草乌甲素和次乌头碱的子离子扫描图, 见图 2。

**1.2.3 兔血浆样品处理测定方法** 精密取 200 μL 兔血浆样品, 精密加入内标工作液 10 μL, 旋涡混匀, 加入 1 mL 乙酸乙酯, 旋涡 3 min, 后以 4000 r/min 离心 10 min, 吸取上清液 600 μL, 氮吹至干, 残渣加甲醇 100 μL 溶解, 15000 r/min 离心 10 min, 取上清液至进样瓶中, 5 μL 进样。

**1.2.4 不同皮肤屏障环境家兔在体透皮试验** (1)正常家兔正常皮肤透皮试验设计。日本大耳白兔 6 只, 雌雄各半, 动物禁食不禁水约 12 h 后, 称重, 体重为 2.16~2.87 kg, 将其放置于试验台上, 用宠物电推剪先将左后肢近臀部待试验区域被毛尽量剔除干净, 剔除过程中应注意勿将兔皮肤划伤。之后用薇婷脱毛膏涂敷于剔毛后皮肤 8 min, 刮匙去除膏体, 用大量温水将脱毛剂冲洗干净, 再将草乌甲素凝胶贴 1 片贴敷在待试验区域。分别于给药前(0 h)和给药后 1 h、2 h、3 h、4 h、5 h、6 h、8 h、10 h, 于耳中央动脉取血约 1.0 mL, 分

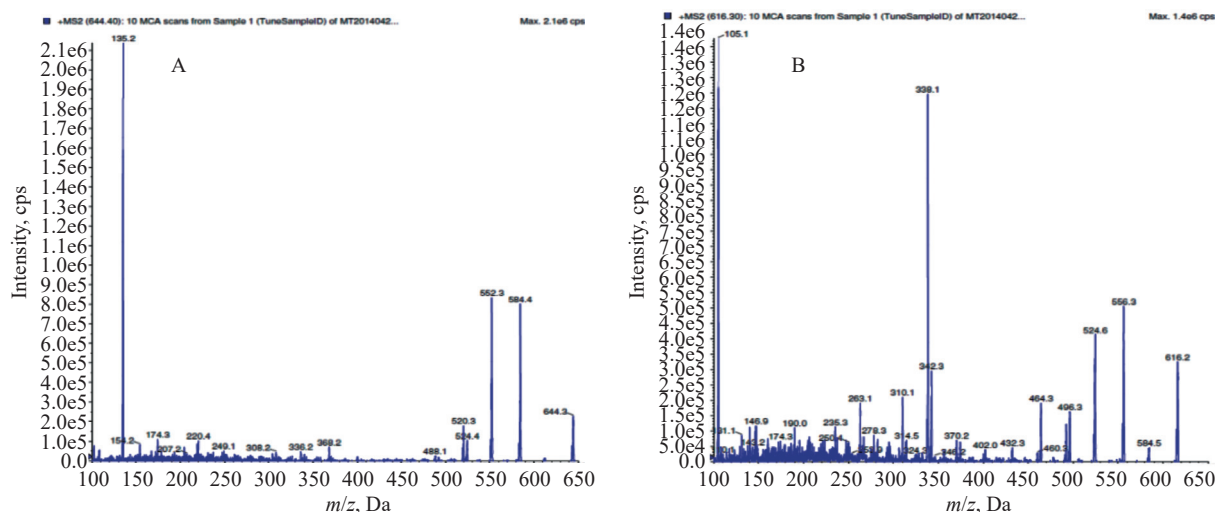


图2 子离子扫描图

Fig. 2 Product ion chromatograms

A: 草乌甲素子离子扫描图谱; B: 次乌头碱子离子扫描图谱。

离血浆,  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存。按“1.2.3 兔血浆样品处理测定方法”测定血药浓度。

(2) 正常家兔破损皮肤透皮试验设计。日本大耳白兔6只, 雌雄各半, 动物禁食不禁水约12 h后, 称重, 体重为2.17~2.60 kg, 将其放置于试验台上, 用宠物电推剪先将左后肢近臀部待试验区域毛尽量剔除干净, 剔除过程中应注意勿将兔皮肤划伤。将1号砂纸包裹在木棒上, 然后在皮肤表面待试验区域轻轻摩擦2~3次, 直至皮肤表面变为浅红即可。将草乌甲素凝胶贴1片贴敷在待试验区域。分别于给药前(0 h)和给药后1 h、2 h、3 h、4 h、5 h、6 h、8 h、10 h、12 h、24 h、36 h, 于耳中央动脉取血约1.0 mL, 分离血浆,  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存。按“1.2.3 兔血浆样品处理测定方法”测定血药浓度。

(3) 病理损伤家兔正常皮肤透皮试验设计。对比家兔软组织物理挫伤-砝码自由落体挫伤法和化学损伤-50%甘油肌肉注射法, 造模后通过病理切片、造模影响因素、操作重现性、动物福利等方面进行对比, 最后选定50%甘油肌肉注射法进行软组织化学损伤, 获得病理损伤模型, 将甘油与生理盐水按体积比1:1混合均匀制成50%甘油(V/V), 家兔称重, 按照1.25 mL/kg.bw计算所需注射量, 将家兔固定于试验台上, 在家兔左后肢近臀部软组织进行注射, 注射结束后, 每日观察家兔精神状态、注射部位皮肤表面有无破损、红斑等异常, 造模后第4天若各动物均无异常即可用于透皮试验。

造模动物禁食不禁水约12 h后, 称重, 体重

为2.44~2.83 kg, 按“(1)正常家兔正常皮肤透皮试验设计”进行试验。

(4) 病理损伤家兔破损皮肤透皮试验设计。选择日本大耳白兔6只, 雌雄各半, 于在体透皮试验前第4 d, 按“(3)病理损伤家兔正常皮肤透皮试验设计”, 对各家兔左后肢近臀部进行病理损伤造模, 每日观察动物一般状况, 造模后第4天若各动物均无异常, 造模动物禁食不禁水约12 h后, 称重, 体重为2.12~2.66 kg, 按“(2)正常家兔破损皮肤透皮试验设计”进行皮肤破损后, 即可用于透皮试验。

### 1.3 统计学处理

4种皮肤屏障模型家兔草乌甲素血药浓度应用DAS 3.2.0实用药代计算程序进行药代参数计算。药代参数以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示, 采用SPSS 23.0软件对药代参数进行统计分析, 数据符合正态分布且组间方差齐的药代参数采用单因素方差分析, 数据不符合正态分布或虽符合正态分布但组间方差不齐的药代参数采用非参数检验中独立样本“克鲁斯卡尔-沃利斯单因素ANOVA检验(k个样本)”,  $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 方法学验证结果

**2.1.1 特异性** 本试验所建立的液质条件下, 空白样品中杂质没有干扰, 草乌甲素及内标次乌头碱峰形较好, 两者保留时间分别为1.21 min和1.19 min, 见图3。

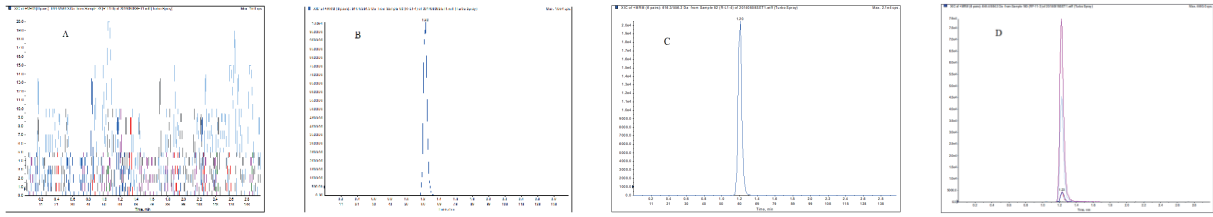


图 3 专属性考察图

Fig. 3 Investigation of method specificity

A: 空白兔血浆; B: 草乌甲素-血浆加标; C: 次乌头碱-血浆加标; D: 草乌甲素-含药血浆。

**2.1.2 基质效应** 本实验针对低、中、高 3 个浓度, 考察了空白兔血浆经提取后, 内源性杂质对草乌甲素和内标次乌头碱的离子抑制情况。结果显示, 草乌甲素兔血浆质控样品在 0.2050、3.275、52.50 ng/mL 3 个浓度下的基质效应 ( $n=6$ ) 分别为 92.49%、94.92%、97.28%; 内标次乌头碱基质效应 ( $n=6$ ) 分别为 91.32%、94.55%、103.07%。结果表明, 在本试验色谱条件下可忽略基质效应的影响。

**2.1.3 标准曲线和线性范围** 以草乌甲素血浆药物浓度  $C$  (分别为 0.025 50、0.051 00、0.205 0、0.820 0、3.275、13.10、52.50 ng/mL) 为横坐标, 草乌甲素峰面积 ( $A_b$ ) 和内标峰面积 ( $A_i$ ) 比值为纵

坐标  $Y$ , 采用加权最小二乘法拟合, 权重系数  $w=1/C^2$ , 正常家兔正常皮肤与病理损伤家兔正常皮肤回归方程为:  $Y=0.0397C+0.000957$  ( $r^2=0.9968$ ), 权重系数  $w=1/C^2$ , 药物浓度与峰面积间线性关系良好, 线性范围为 0.025 50 ~ 52.50 ng/mL, 最低定量限为 0.025 50 ng/mL ( $S/N>10$ )。

**2.1.4 精密度和准确度** 制备浓度分别为 0.2050、3.275、52.50 ng/mL 的草乌甲素兔血浆质控样品, 按“1.2.3 兔血浆样品处理测定方法”项下操作, 重复 3 d, 随行的标准曲线计算测定浓度, 由实测浓度计算批内与批间精密度的, 每批实测浓度的平均值与理论浓度的比值为准确度, 见表 1。

表 1 LC-MS/MS 测定兔血浆中草乌甲素的精密度和准确度及回收率 [ $(\bar{x} \pm s)$ ,  $n=6$ ]Tab. 1 Determination of precision, accuracy and recovery of Bulleyaconitin A in rabbit plasma by LC-MS/MS [ $(\bar{x} \pm s)$ ,  $n=6$ ]

质控浓度 (ng/mL)	日内( $n=6$ )		日间( $n=18$ )		回收率 ( $n=6$ )(%)
	(ng/mL)	精密度(%) 准确度(%)	(ng/mL)	精密度(%) 准确度(%)	
0.2050	0.2070±0.01000	4.83 100.98	0.2002±0.0179	8.94 97.66	81.74±1.67
3.275	3.024±0.266	8.80 92.34	3.086±0.255	8.26 94.23	82.11±2.88
52.50	50.98±2.45	4.80 97.10	54.39±4.14	7.61 103.60	87.21±2.55

**2.1.5 提取回收率** 制备浓度分别为 0.2050、3.275、52.50 ng/mL 的草乌甲素兔血浆质控样品, 按“1.2.3 兔血浆样品处理测定方法”项下操作, 测定得草乌甲素与内标次乌头碱峰面积比值为  $PD_{有}$ ;

精密移取 200  $\mu$ L 空白兔血浆, 不加目标物和内标, 按“1.2.3 兔血浆样品处理测定方法”项下操作提取后得到的含基质残渣, 用浓度分别为 0.2460、3.930、63.00 ng/mL 的草乌甲素、14.58 ng/mL 次乌头碱工作液复溶, 测定得草乌甲素与内标次乌头碱峰面积比值为  $PA_{有}$ 。  $PD_{有}$  和  $PA_{有}$  的百分比即为提取回收率, 见表 1。

**2.1.6 稳定性** 制备浓度分别为 0.2050、3.275、52.50 ng/mL 的草乌甲素兔血浆质控样品, 考察兔血浆样品于室温放置 24 h、2 ~ 8  $^{\circ}$ C 存放 24 h、于-

20  $^{\circ}$ C 放置 5 d、于 -20  $^{\circ}$ C 放置 5 d 冻融 3 次的稳定性; 同时考察按“1.2.3 兔血浆样品处理测定方法”项下操作处理后样品在室温及 2 ~ 8  $^{\circ}$ C 放置 3 d 的稳定性, 以随行的标曲计算测定浓度与理论浓度比较。准确度低、中、高浓度质控均在 (100  $\pm$  15)% 范围内, 结果表明在上述条件下草乌甲素稳定。

## 2.2 病理损伤造模病理检查结果

物理挫伤和化学损伤造模后病理检查结果, 镜下均可见程度不等的出血、肌纤维坏死, 部分样本出现水肿、肉芽组织形成、瘢痕组织形成病变, 说明病理损伤造模成功。但物理挫伤造模解剖时, 偶见胸腔、腹腔均出血, 肾脏、肝脏、脾脏均有一定损伤。造模效果不一致, 且造模重复性差。化学损伤造模后形成的软组织病变类型和

病变程度较一致, 影响因素少, 造模易成功, 也更符合动物福利保护要求。因此, 选定化学损伤-

50% 甘油肌肉注射法为本研究最适软组织病理损伤模型的造模方法, 结果见图4、图5。

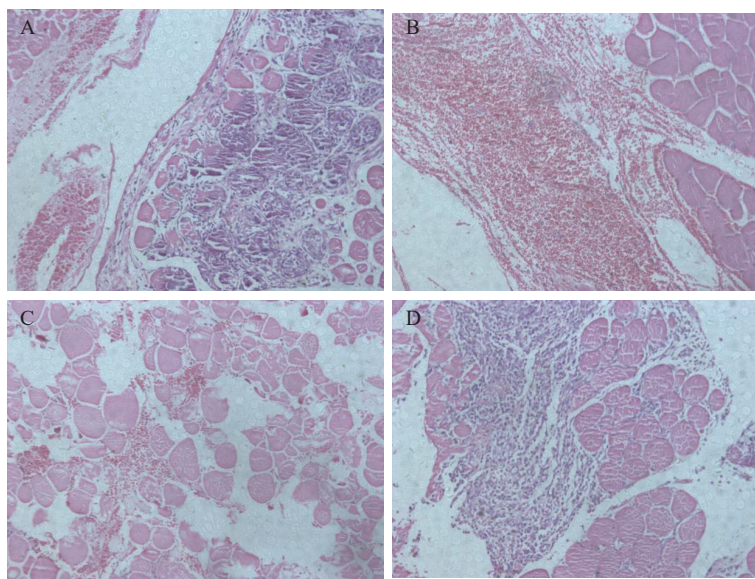


图4 物理挫伤病理检查( $\times 10$ )

Fig. 4 Pathological examination of physical contusion( $\times 10$ )

A: 出血、肌纤维坏死; B: 出血; C: 出血、水肿、肌纤维坏死; D: 肉芽组织、瘢痕形成。

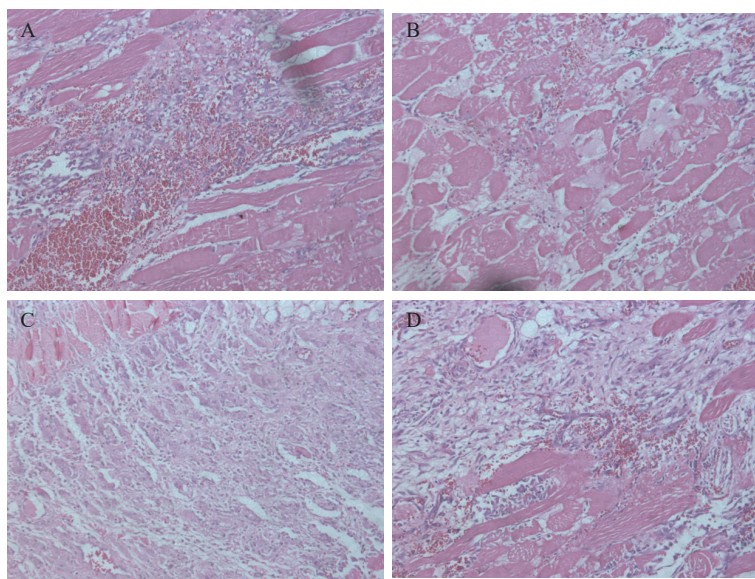


图5 化学损伤病理检查( $\times 10$ )

Fig. 5 Pathological examination of chemical damage( $\times 10$ )

A: 出血、肌纤维坏死; B: 水肿、肌纤维坏死; C: 肌纤维坏死、瘢痕形成; D: 出血、肌纤维坏死、肉芽组织形成。

### 2.3 4种皮肤模型家兔在体透皮吸收药代动力学结果

AUC(0-t)、AUC(0- $\infty$ )、C<sub>max</sub> 3个药代参数在4种皮肤屏障模型家兔的变化趋势一致, 由大至小的顺序为: 正常家兔破损皮肤>病理损伤破损皮肤>病理损伤正常皮肤>正常家兔正常皮肤; T<sub>max</sub> 由大至小的顺序为: 病理损伤破损皮肤>正

常家兔正常皮肤>正常家兔破损皮肤>病理损伤正常皮肤; t<sub>1/2z</sub> 由大至小的顺序为: 病理损伤破损皮肤>正常家兔破损皮肤>正常家兔正常皮肤>病理损伤正常皮肤; CL 由大至小的顺序为: 正常家兔正常皮肤>病理损伤正常皮肤>正常家兔破损皮肤>病理损伤破损皮肤, 药代参数结果见表2, 不同模型家兔药时曲线, 见图6。

表 2 4 种不同皮肤模型家兔体内主要药动学参数  $[(\bar{x} \pm s), n = 6]$ 

参数	正常家兔正常皮肤	正常家兔破损皮肤	病理损伤正常皮肤	病理损伤破损皮肤
AUC(0-t)( $\mu\text{g/L}\cdot\text{h}$ )	2.199 $\pm$ 2.204	25.117 $\pm$ 16.462	2.682 $\pm$ 1.834	20.834 $\pm$ 11.167
AUC(0- $\infty$ )( $\mu\text{g/L}\cdot\text{h}$ )	3.215 $\pm$ 4.099	25.637 $\pm$ 16.244	3.059 $\pm$ 1.934	21.553 $\pm$ 10.376
Cmax( $\mu\text{g/L}$ )	0.379 $\pm$ 0.316	2.495 $\pm$ 1.570	0.472 $\pm$ 0.302	1.655 $\pm$ 0.828
Tmax(h)	3.667 $\pm$ 1.033	3.5 $\pm$ 1.378	3.167 $\pm$ 0.983	4.833 $\pm$ 1.472
t1/2z(h)	3.573 $\pm$ 2.725	9.533 $\pm$ 10.476	3.071 $\pm$ 0.885	13.244 $\pm$ 22.289
CL(L/h)	3882.402 $\pm$ 3555.427	362.47 $\pm$ 446.772	1709.041 $\pm$ 849.386	251.724 $\pm$ 192.713

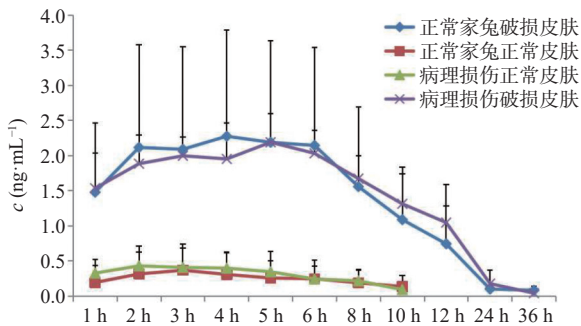


图 6 草乌甲素在 4 种不同皮肤模型家兔体内平均药-时曲线

Fig. 6 The average plasma concentration-time curves of Bulleyaconitine A in rabbits with four different skin models

皮肤状态是影响草乌甲素吸收、消除的主要因素，角质层是限制吸收的主要屏障，皮肤正常或破损，只要状态一致，是否受内伤，对于草乌甲素家兔透皮给药的吸收和消除没有显著性影响，吸收程度、消除能力与皮肤状态紧密相关，皮肤受到损伤，草乌甲素的透过量大幅升高、消除能力显著降低，差异有统计学意义( $P < 0.05$ )，但消除速度却无明显影响，见表 3。

病理损伤模拟内伤生理状态，皮肤正常时，与正常家兔正常皮肤相比，草乌甲素的吸收程度

稍大、吸收速度稍快、消除能力稍弱，但差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。当皮肤破损时，病理损伤模拟内伤生理状态，与正常家兔破损皮肤相比，草乌甲素的吸收程度稍小、吸收速度稍慢、消除能力稍弱，但差异无统计学意义( $P > 0.05$ )，见表 3。

模拟外伤所致正常家兔破损皮肤、内外伤的病理损伤破损皮肤与正常家兔正常皮肤相比，草乌甲素吸收程度均大幅提高、消除能力明显降低，差异有统计学意义( $P < 0.05$ )，见表 3。提示外伤或内外伤状态下，可能导致草乌甲素在体内蓄积，影响用药安全，后期对草乌甲素透皮贴剂进行药理药效、药代及毒代研究时，应选用模拟外伤所致的破损皮肤或内外伤的病理损伤破损皮肤模型同时进行对比研究，以获得更加准确的评价结果。

### 3 讨论

#### 3.1 透皮吸收差异大

由检测结果可知，草乌甲素凝胶贴在 4 种不同皮肤屏障模型 6 只家兔组内血药浓度差异较大，

表 3 4 种皮肤模型家兔体内主要药动学参数显著性差异统计结果

Tab. 3 Statistical results of significant differences about main pharmacokinetic parameters in rabbits with four different skin models

药动学参数	正常家兔正常皮肤- 正常家兔破损皮肤	病理损伤正常皮肤- 病理损伤破损皮肤	正常家兔正常皮肤- 病理损伤正常皮肤	正常家兔破损皮肤- 病理损伤破损皮肤	正常家兔正常皮肤- 病理损伤破损皮肤
$P$ [AUC(0-t)( $\mu\text{g/L}\cdot\text{h}$ )]	<0.016*	<0.003*	<0.522	<0.609	<0.02*
$P$ [AUC(0- $\infty$ )( $\mu\text{g/L}\cdot\text{h}$ )]	<0.010*	<0.002*	<0.522	<0.615	<0.02*
$P$ [Cmax( $\mu\text{g/L}$ )]	<0.025*	<0.025*	<0.522	<0.273	<0.016*
$P$ [Tmax(h)]	<0.817	<0.044*	<0.411	<0.136	<0.143
$P$ [t1/2z(h)]	<0.078	<0.055	<0.749	<0.337	<0.150
$P$ [CL(L/h)]	<0.010*	<0.006*	<0.522	<0.423	<0.006*

\* $P < 0.05$ 。

推测产生差异的原因可能由于不同个体间角质层厚度或皮肤敏感程度不同, 从而导致透过率差异。

### 3.2 局部组织浓度高

在实验中检测4种皮肤屏障模型家兔给药局部肌肉药物浓度, 结果表明给药局部肌肉的药物浓度平均值的大小顺序: 正常家兔破损皮肤>病理损伤破损皮肤>病理损伤正常皮肤>正常家兔正常皮肤, 与上述4种皮肤屏障模型家兔所获AUC、C<sub>max</sub> 平均值的变化趋势一致。4种皮肤屏障模型, 均呈现给药局部贴膏正下方肌肉药物浓度>血药浓度>未贴膏部位肌肉组织药物浓度, 说明贴膏正下方肌肉组织为药物经皮进入后的富集区, 即当草乌甲素从凝胶贴中透皮吸收到达肌肉组织后, 缓慢富集在贴膏正下方的肌肉组织中, 从而为发挥局部治疗作用提供药效物质基础。由此可解释为何外用制剂临床经皮肤给药后, 血浆中常常测不到药物, 但是药物依然能在给药局部发挥药效作用的原因, 提示在外用制剂药物浓度检测或药效物质基础研究时可考虑采用实验动物给药局部肌肉组织进行检测。

### 3.3 正常-病理模型对照

有学者进行正常与病理状态大鼠灌胃给药后药代动力学对比研究表明<sup>[24-29]</sup>, 病理状态会引起体内环境的变化, 对药物的吸收和代谢均会产生影响, 使正常与病理状态药动学参数存在较大差异, 有必要进行正常与病理模型实验动物对比研究, 助于临床精准治疗。本研究进行家兔经皮给药结果表明皮肤或肌肉状态不同, 草乌甲素的透皮吸收药动参数差异较大, 建议后期进行经皮给药制剂试验研究时, 应根据药物特性、药理作用特点同时选择试验动物正常皮肤和破损皮肤、甚至药物关联的药理作用及适应症的病理损伤模型的破损和(或)正常皮肤进行对比研究, 将有助于全面准确地评价经皮给药制剂作用特点和安全性。

### [参考文献]

[1] Xie M X, Zhu H Q, Pang R P, et al. Mechanisms for therapeutic effect of Bulleyaconitine A on chronic pain[J]. *Molecular Pain*, 2018, 14: 1-10.

[2] Zhu H Q, Xu J, Shen K F, et al. Bulleyaconitine A depresses neuropathic pain and potentiation at C-fiber synapses in spinal dorsal horn induced by paclitaxel in

rats[J]. *Exp Neurol*, 2015, 273: 263-272.

[3] 刘延青, 丁晓宁, 王应德. 草乌甲素片治疗常见慢性疼痛的临床研究[J]. *中国疼痛医学杂志*, 2011, 17(5): 314-315.

[4] Xu L, Lao LX, Ge A, et al. Chinese herbal medicine for cancer pain[J]. *Integrative Cancer Therapies*, 2007, 6(3): 208-234.

[5] 吴玲普. 草乌甲素对膝关节骨折术后运动疼痛的干预[D]. 广州: 广州中医药大学, 2010.

[6] 王薇. 北京市癌痛治疗现状调查分析及草乌甲素治疗轻中度癌痛的临床研究[D]. 北京: 中国中医科学院, 2019.

[7] 牛占国, 陈晓武, 黄静, 等. 草乌甲素片用于烧伤创面镇痛效果的临床观察[J]. *吉林医学*, 2014, 35(31): 7001-7002.

[8] 李芳, 倪家骧, 武百山, 等. 草乌甲素胶丸辅助硫酸吗啡缓释片治疗中晚期癌痛[J]. *长春中医药大学学报*, 2014, 30(3): 460-462.

[9] Wang C F, Gerner P, Schemidt B, et al. Use of Bulleyaconitine A as an adjuvant for prolonged cutaneous analgesia in the rat[J]. *Anesthesia & Analgesia*, 2018, 107(4): 1397-1405.

[10] Peng J, Xiao S, Xie J, et al. Bulleyaconitine A reduces fracture-induced pain and promotes fracture healing in mice[J]. *Front Pharmacol*, 2023, 14: 1046514.

[11] 陈新鹏, 陈娟, 曾惠琼, 等. 草乌甲素片联合甲氨喋呤治疗类风湿关节炎的临床疗效[J]. *临床医学*, 2018, 38(5): 116-118.

[12] Zhan X D, Zhang W Q, Sun T, et al. Bulleyaconitine A effectively relieves allergic lung inflammation in a murine asthmatic model[J]. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 2019, 25: 1656-1662.

[13] 张文琪. 草乌甲素对过敏性哮喘小鼠肺部炎症的治疗与机理初步探讨[D]. 芜湖: 皖南医学院, 2019.

[14] 孙甜, 吕业超, 唐小牛, 等. 草乌甲素对LPS诱导的RAW264.7细胞抗炎作用及相关机制研究[J]. *泰山医学院学报*, 2020, 41(5): 321-327.

[15] Liu L P, Wang S Y, Xing H Y, et al. Bulleyaconitine a inhibits the lung inflammation and airway remodeling through restoring Th1/Th2 balance in asthmatic model mice[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2020, 84(7): 1409-1417.

- [16] 陈建洪, 邓莎, 吴志云, 等. 草乌甲素胶丸治疗肩周炎的疗效观察[J]. *临床合理用药杂志*, 2012, 5(26): 30.
- [17] 潘国兴, 杜冬萍. 草乌甲素联合玻璃酸钠关节腔内注射治疗膝关节骨性关节炎的疗效[J]. *上海医学*, 2013, 36(6): 523-526.
- [18] 李冬冬, 殷娜, 王志伟. 草乌甲素片联合筋骨痛消丸治疗早中期膝关节关节炎45例临床观察[J]. *风湿病与关节炎*, 2019, 8(6): 27-30.
- [19] Weng W Y, Xu H N, Huang J M, et al. A pharmacokinetic study of intramuscular administration of Bulleyaconitine A in healthy volunteers [J]. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 2005, 28(4): 747-749.
- [20] 肖若兰. 草乌甲素多囊脂质体和聚合物胶束给药系统的研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2008.
- [21] 吴晓辉. 草乌甲素微乳及其水性基质经皮给药系统研究[D]. 北京: 中国协和医科大学, 2006.
- [22] 张伟, 张玲, 杨兆祥. HPLC法测定草乌甲素贴释放度[J]. *云南中医学院学报*, 2010, 33(3): 21-24, 29.
- [23] 翁伟宇. 草乌甲素经皮渗透特性及其透皮给药系统的研究[D]. 上海: 复旦大学, 2004.
- [24] 廖淑彬, 陈丹, 余文静, 等. 三叶青地上部分抗炎提取物效应组分群不同生理状态体内组织分布规律及特性研究[J]. *中国中药杂志*, 2021, 46(5): 1224-1249.
- [25] 郝晶晶, 郭瑛玉, 胡海燕, 等. 金红片中活性成分在正常大鼠和浅表性胃炎大鼠体内的药代动力学研究[J]. *药物分析杂志*, 2023, 43(9): 1565-1573.
- [26] 刘莹, 贾兰, 张晓喻, 等. 大黄素配伍黄芩素在正常和2型糖尿病大鼠中药代动力学研究[J]. *中国临床药理学杂志*, 2023, 39(19): 2834-2838.
- [27] Liu F, Nong X, Qu W, Li X. Pharmacokinetics and tissue distribution of 12 major active components in normal and chronic gastritis rats after oral administration of Weik-angling capsules [J]. *Journal of Ethnopharmacol*, 2023, 316: 116722.
- [28] Zhou H, He Y, Zheng Z, et al. Pharmacokinetics and tissue distribution study of 18 bioactive components in healthy and chronic heart failure rats after oral administration of Qi-Shen-Ke-Li formula using ultra-high-performance liquid chromatography/triple quadrupole mass spectrometry [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2021, 35(8): 9060.
- [29] Mei Y D, Tong X Y, Hu Y M, et al. Comparative pharmacokinetics of six bioactive components of Shen-Wu-Yi-Shen tablets in normal and chronic renal failure rats based on UPLC-TSQ-MS/MS [J]. *Journal of Ethnopharmacol*, 2023, 317: 116818.