

鬼臼毒素醇质体的体外经皮渗透特性研究

于燕燕, 赵继会, 冯年平*, 张永太, 施晓琴
上海中医药大学中药学院, 上海 201203

摘要: 目的 研究鬼臼毒素醇质体经皮渗透特性。方法 通过体外经皮渗透试验, 比较鬼臼毒素在大鼠皮肤中的稳态透皮速率和皮肤滞留量, 分别考察以醇质体、酊剂、脂质体、30%乙醇混悬液以及鬼臼毒素与空白醇质体物理混合物作为载体, 鬼臼毒素经皮渗透特性。结果 鬼臼毒素醇质体的 12 h 皮肤滞留量为 $8.17 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, 高于其他各组; 稳态透皮速率小于鬼臼毒素载药量为 0.5% 的脂质体组及乙醇混悬液组 ($P < 0.05$), 与其他对照组无显著差异。结论 醇质体具有较大的皮肤滞留量及较小的透皮速率。

关键词: 鬼臼毒素; 醇质体; 稳态透皮速率; 累积透过量; 皮肤滞留量

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)01-0074-04

Percutaneous permeation characteristic of podophyllotoxin ethosomes *in vitro*

YU Yan-yan, ZHAO Ji-hui, FENG Nian-ping, ZHANG Yong-tai, SHI Xiao-qin

College of Chinese Materia Medica, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

Abstract: Objective To study the percutaneous permeability characteristic of podophyllotoxin (POD) ethosomes *in vitro*. **Methods** Excised SD-rat abdomen skin was used as penetration barrier. The steady penetration rate and the skin residual amount were calculated to evaluate the percutaneous permeability of POD from ethosomes, tinctures, liposome, 30% hydro-ethanolic suspension, mixture of drug and blank ethosomes, respectively. **Results** The skin residual amount of POD in the ethosomes group was $8.17 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ in 12 h, higher than those in the other groups. In addition, the steady penetration rate of POD in the ethosomes group decreased significantly compared with those in the liposome group with POD loading being 0.5%, and the hydro-ethanolic suspension group ($P < 0.05$), while no obvious difference was seen among the ethosomes group and the other groups. **Conclusion** Higher skin residual amount and lower steady penetration rate are observed in the ethosomes group.

Key words: podophyllotoxin (POD); ethosomes; steady penetration rate; cumulative transdermal amount; skin deposit amount

鬼臼毒素 (podophyllotoxin, POD) 是从小檗科植物桃耳七 *Sinopodophyllum emodi* (Wall. ex Royle) Ying、八角莲 *Dysosma versipellis* (Hance) M. Cheng ex Ying 或六角莲 *D. pleiantha* (Hance) Woodson 的根及根茎中提取分离得到的木脂素类化合物^[1], 是 WHO 推荐使用治疗尖锐湿疣的一线药物, 其主要作用机制是抑制活性表皮棘层中乳头瘤病毒感染所导致疣状增殖的上皮细胞的分裂和增生, 临床常用 0.5% 的鬼臼毒素酊剂^[2-4]。鬼臼毒素酊剂虽然能去除肉眼可见的病变, 但易损伤真皮, 导致疼痛、糜烂、水肿等, 具有明显的皮肤刺激性, 大面积使用还可产生全身性不良反应, 且极易导致复发^[5-6]。Touitou 等^[7]报道了一种新型经皮给药载体-醇质体

(ethosomes), 即在常规脂质体中添加高浓度的醇制备的含醇脂质体。醇质体可以包封各种类型的药物 (包括水溶性、脂溶性及两亲性药物以及蛋白多肽类分子), 并能达到较高的包封率。本课题组曾采用微柱离心-HPLC 法测定了鬼臼毒素醇质体的包封率^[8], 本实验对鬼臼毒素醇质体离体大鼠皮肤体外经皮渗透特性进行了研究, 并与其他传统的剂型进行比较, 考察 POD 醇质体治疗皮肤疾病的可行性。

1 仪器与材料

TP—5 型智能透皮扩散仪 (天津富兰斯电子科贸有限公司); LC 2010 高效液相色谱仪 (日本岛津公司); CP225D 微量电子分析天平 (德国 Sartotius 公司); JB50—D 型增力搅拌机 (上海标本模型厂);

收稿日期: 2011-05-31

基金项目: 教育部新世纪优秀人才支持计划 (NECT08-0898); 上海市教委重点学科项目 (J50302); 上海市优秀学科带头人项目 (10XD1403900)

作者简介: 于燕燕 (1982—), 女, 江苏滨海人, 博士研究生。Tel: (021)51322198 E-mail: sshnhyyy@yeah.net

*通讯作者 冯年平 Tel/Fax: (021)51322198 E-mail: npfeng@hotmail.com

XW—80A 涡旋混合器(上海精科实业有限公司); Sigma2—16k 型超速冷冻离心机(德国 Sigma 公司)。

POD 对照品(批号 111645-200301, 中国药品生物制品检定所); POD 原料药(批号 081201, 质量分数 >98%, 福建华海药业公司); 鬼臼毒素酊剂(POD-T, 批号 081209, 含 POD 5.0 mg/mL, 福建华海药业公司)。实验室自制: 鬼臼毒素醇质体(POD-E, 含 POD 为 3.5 mg/mL, 磷脂为 50.0 mg/mL, 乙醇体积分数为 30%); 0.5% 鬼臼毒素脂质体(0.5% POD-L, 含 POD 为 5.0 mg/mL, 磷脂为 50.0 mg/mL); 0.35% 鬼臼毒素脂质体(0.35% POD-L, 含 POD 为 3.5 mg/mL, 磷脂为 50.0 mg/mL); 鬼臼毒素 30% 乙醇混悬液(0.35% POD-HES, 含 POD 为 3.5 mg/mL, 乙醇体积分数为 30%); 鬼臼毒素与空白醇质体的物理混合物(POD-M, 将 POD 与空白醇质体物理混合制成含 POD 3.5 mg/mL 的混合物)。所用化学试剂均购自中国医药集团上海化学试剂公司, 高效液相色谱仪用试剂均为色谱纯, 其余均为分析纯。

SD 大鼠, 雌雄不限, 体质量(180±10) g, 上海中医药大学实验动物中心, 动物许可证号: SYXK(沪) 2009-0069。

2 方法与结果

2.1 离体皮肤制备

取 SD 大鼠, 腹部用自制脱毛膏脱毛, 饲养 24 h, 实验前断颈处死, 剪下腹部皮肤, 小心剔除皮下组织和脂肪, 以生理盐水洗净, 备用。

2.2 体外经皮渗透试验

将皮肤固定于扩散池接口处, 使角质层面向供给室, 真皮层面向接收室。分别精密移取 POD-E、POD-T、0.5% POD-L、0.35% POD-L、0.35% POD-HES 以及 POD-M 各 0.5 mL 涂于皮肤表面, 以 30% 乙醇生理盐水溶液为接收液, 体积为 17 mL。开动恒温水浴循环(37±1) °C 和磁力加热搅拌器(300 r/min) 开始计时, 在设定时间点 1、2、3、4、6、8、12 h 分别从接收室内取样 1 mL, 并补充等体积 37 °C 新鲜接收液。样品液用 0.2 μm 微孔滤膜滤过后, 采用 HPLC 法检测, 计算累积渗透量(Q), 以 Q 对时间 t 进行线性回归, 所得方程的斜率即为透皮速率常数 [J_s , μg/(cm²·h)]。

$$Q = (17C_n + \sum_{i=1}^{n-1} C_i) / A$$

C_n 为第 n 个取样点测得的药物质量浓度(μg/mL), C_i 为第 i 个取样点测得的药物质量浓度(μg/mL), A 为渗透面积(cm²)

2.3 皮肤样品的处理

分别取体外经皮渗透试验给药后的皮肤 1 cm², 洗去表面残留物, 剪碎, 加入生理盐水 0.5 mL 匀浆, 5 000 r/min 离心 10 min, 精密移取上清液 200 μL, 转移入 2 mL 离心管中, 加入 1 mL 醋酸乙酯, 涡旋 3 min, 5 000 r/min 离心 10 min, 取上层有机相, 氮气吹干, 200 μL 甲醇复溶, 涡旋 3 min 后, 在 4 °C 下, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液采用 HPLC 法检测, 计算不同时间单位面积皮肤滞留量(Q_s)。

$$Q_s = C_s \times 0.5 / A$$

C_s 为第 n 个时间点测得的皮肤样品液中药物质量浓度(μg/mL), A 为渗透面积(cm²)

2.4 接收液中 POD 的测定

2.4.1 色谱条件 色谱柱为 Diamonsil C₁₈ ODS 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-1%醋酸溶液(65:35), 检测波长 292 nm, 体积流量 1 mL/min, 柱温 25 °C。

2.4.2 线性关系考察 精密称取 POD 对照品 25.28 mg, 置 25 mL 棕色量瓶中, 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 得 1 011.20 μg/mL 对照品贮备液。用空白接收液分别将对照品溶液稀释成 101.12、50.56、25.28、10.11、5.06、2.53 μg/mL 对照品溶液。HPLC 法测定, 以峰面积(A)对质量浓度(C)进行线性回归, 得回归方程 $A = 11\,936.943 C - 3\,146.723$ ($r = 0.999\,9$), 表明 POD 在 2.53~101.12 μg/mL 与色谱峰面积呈良好的线性关系, 空白皮肤透过液对 POD 测定无干扰。色谱图见图 1。

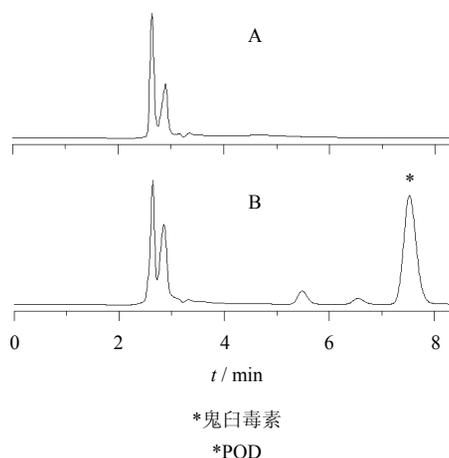


图 1 空白皮肤透过液(A)和皮肤透过液(B)的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of blank skin penetration solution (A) and skin penetration solution of POD *in vitro* (B)

2.4.3 精密度试验 分别配制 2.53、50.56、101.12 $\mu\text{g/mL}$ 3 个质量浓度的皮肤接收液样品, 分别于 1 d 内测定 5 次, 连续进样 5 d, 记录峰面积, 计算日内和日间精密度。结果日内 RSD 分别为 0.94%、0.80%、0.25%; 日间 RSD 分别为 0.79%、1.99%、0.92%。供试品溶液的日内差、日间差均在 2% 以内, 符合测定要求。

2.5 皮肤中 POD 的测定

2.5.1 色谱条件 色谱柱为 Diamonsil C_{18} ODS 柱 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-1%醋酸溶液 (60:40), 检测波长 292 nm, 体积流量 1 mL/min, 柱温 25 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.5.2 线性关系考察 取 POD 对照品贮备液与空白皮肤, 照“2.3”项下进行操作, 分别配制成 0.51、1.01、2.02、5.06、10.11、25.28、50.56 $\mu\text{g/mL}$ 对照品溶液, HPLC 法测定, 以峰面积 (A) 对质量浓度 (C) 进行线性回归, 得回归方程 $A=12\,541.338\,C-8\,203.161$ ($r=0.999\,8$), 表明 POD 在 0.51~50.56 $\mu\text{g/mL}$ 与峰面积呈良好的线性关系。空白皮肤样品液无干扰。色谱图见图 2。

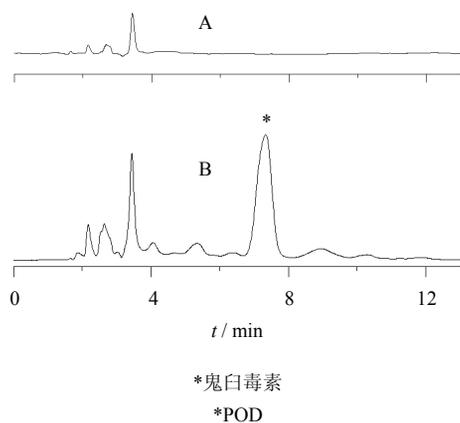


图 2 空白皮肤样品液 (A) 及皮肤样品液 (B) 的 HPLC 色谱图

Fig. 2 HPLC chromatograms of blank skin homogenate (A) and POD skin residual samples (B)

2.5.3 回收率试验 根据预试验检测结果, 分别以对照品贮备液与空白皮肤, 配制 0.51、5.06、50.56 $\mu\text{g/mL}$ 3 个质量浓度的供试品溶液, 平行操作 5 份, HPLC 法分析, 计算回收率。3 个质量浓度供试品溶液的回收率分别为 (87.16 \pm 2.75)%、(95.20 \pm 0.33)%、(102.19 \pm 0.25)% ($n=5$)。

2.5.4 精密度考察 取回收率试验配制的 3 个质量浓度的供试品溶液, 分别于 1 d 内测定 5 次, 连续

进样 5 d, 记录峰面积, 计算日内和日间精密度。结果日内 RSD 分别为 1.89%、0.34%、0.27%; 日间 RSD 分别为 0.73%、0.47%、0.72%。供试品溶液的日内差、日间差均在 2% 以内, 符合测定要求。

2.6 体外经皮渗透试验

2.6.1 药物 J_s 与单位面积 Q 分别测定醇质体与各对照组的药物 J_s 和 12 h 单位面积 Q , 结果见表 1 和图 3。

表 1 POD 醇质体与各对照组的 J_s 和 12 h 单位面积 Q ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 1 J_s and Q per cm^2 in 12 h between POD-E and each control group ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组 别	$J_s / (\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1})$	$Q / (\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2})$
POD-E	10.246 \pm 1.169	127.121 \pm 13.968
0.35% POD-L	13.378 \pm 2.778	155.899 \pm 27.014
0.5% POD-L	26.749 \pm 9.097	283.600 \pm 74.697
POD-T	12.930 \pm 2.978	141.835 \pm 34.279
POD-HES	4.780 \pm 0.960	60.057 \pm 16.849
POD-M	11.707 \pm 1.375	134.747 \pm 14.758

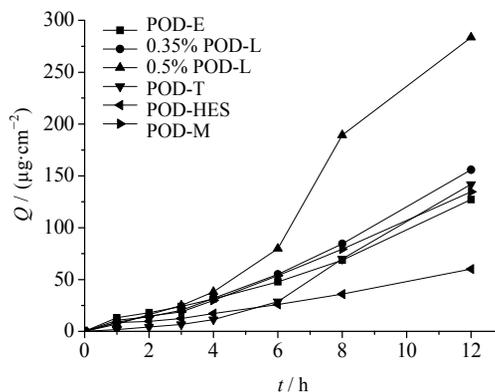


图 3 POD 醇质体与各对照组的单位面积平均累积体外透皮量-时间曲线 ($n=5$)

Fig. 3 Mean cumulative penetration amounts of POD per cm^2 *in vitro* vs time profiles between POD-E and each control group ($n = 5$)

由图 3 可知, 单位面积 Q 比较结果为: 0.5% POD-L>0.35% POD-L>POD-T>POD-M>POD-E>POD-HES。对各组的透皮数据进行方程拟合, 零级释放方程效果最好。稳态 J_s 比较结果为: 0.5% POD-L>0.35% POD-L>POD-T>POD-M>POD-E>POD-HES。POD-E 在 12 h 的稳态 J_s 小于脂质体与酊剂, 并与 0.5% POD-L 及 POD-HES 有显著差异 ($P<0.05$); POD-M 与 POD-E 的 J_s 相近且明显高于

POD-HES ($P < 0.05$), 表明该醇质体对药物具有一定的促渗作用, 这种作用可能是由于乙醇、囊泡和皮肤间脂质三者协同作用的结果。

2.6.2 药物皮肤滞留量 分别测定醇质体与各对照组单位面积内皮肤滞留量, 结果见图 4。随着时间的延长, POD-E、0.35% POD-L、0.5% POD-L 组皮肤滞留量呈明显上升趋势, 而对照组皮肤滞留量增长缓慢, POD-E 组在各时间段的皮肤滞留量均高于对照组。

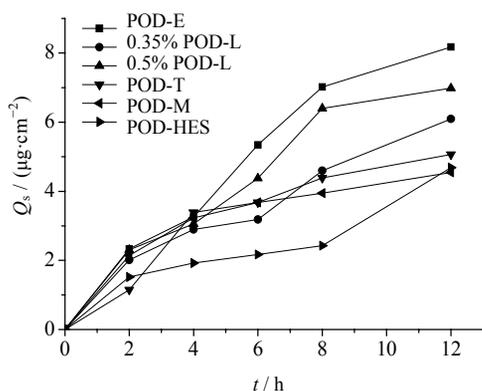


图 4 POD 醇质体与各对照组单位面积内皮肤滞留量-时间曲线 ($n = 5$)

Fig. 4 Skin residual amount per cm^2 of POD-time profiles between POD-E group and each control group ($n = 5$)

3 讨论

与脂质体及酞剂相比, 鬼臼毒素醇质体具有较小的 J_s 及较大的皮肤滞留量。其中 POD-E 12 h 的皮肤滞留量为 $8.17 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、物理混合物为 $4.69 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, 两者的 J_s 没有显著差异, 表明醇质体的囊泡可以完整地穿过角质层, 从而提高药物在皮肤内的滞留量, 差示扫描量热法 (DSC) 检测结果显示醇质体囊泡的相变温度较低 (T_m 为 $-11.4 \text{ }^\circ\text{C}$, 鬼臼毒素脂质体的 T_m 为 $20.1 \text{ }^\circ\text{C}$), 提示醇质体囊泡的流动性较大, 柔性较强。结合乙醇水溶液的数据, 推测醇质体系统中药物的透皮吸收可能是乙醇、囊泡和皮肤间脂质协同作用的结果: 乙醇为优良的促渗剂, 能够改变角质层脂质分子的紧密排列, 增强脂质的流动性; 醇质体囊泡的柔性使得醇质体在传递过程中较易携带包封的药物渗入皮肤深部^[9-12]; 另有报道称乙醇能促进角质层脂质分子与脂质材料融合, 引起醇质体内药物的释放^[7]。

经处方优化得到 0.35% 的醇质体, 由于临床上

常用的是 0.5% 的酞剂, 故设计了 0.5% 的脂质体。0.35% 的醇质体与 0.5% 的酞剂的皮肤滞留量相当, 但减少了药物用量及乙醇体积分数, 皮肤透过量也明显减少, 可提高用药安全性。

参考文献

- [1] 姜 飞, 田海妍, 张建龙, 等. 八角莲的化学成分研究 [J]. 中草药, 2011, 42(4): 634-639.
- [2] Tzathas C, Stavrianeas N G, Triantafyllou K, et al. Long-term follow-up of endoscopic therapy of anal canal condylomata acuminata with podophyllotoxin [J]. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 2007, 21(3): 364-367.
- [3] Brodell L A, Mercurio M G, Brodell R T. The diagnosis and treatment of human papillomavirus-mediated genital lesions [J]. *Cutis*, 2007, 79(4 Suppl): 5-10.
- [4] 王家璧, 刘跃华, 晋红中, 等. 尖锐湿疣的临床与实验研究 [J]. 中国医学科学院学报, 2000, 22(5): 487-490.
- [5] Longstaff E, von Krogh G. Condyloma eradication: self-therapy with 0.15%—0.5% podophyllotoxin versus 20%—25% podophyllin preparations — an integrated safety assessment [J]. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2001, 33(2): 117-137.
- [6] Imbert T F. Discovery of podophyllotoxins [J]. *Biochimie*, 1998, 80(3): 207-222.
- [7] Touitou E, Bergelson L, Godin B, et al. Ethosomes-novel vesicular carriers for enhanced delivery: characterization and skin penetration properties [J]. *J Controlled Release*, 2000, 65(3): 403-418.
- [8] 于燕燕, 赵继会, 冯年平, 等. 微柱离心-HPLC 法测定鬼臼毒素醇质体的包封率研究 [J]. 中草药, 2010, 41(10): 1634-1637.
- [9] Dayan N, Touitou E. Carriers for skin delivery of trihexyphenidyl HCl: ethosomes vs liposomes [J]. *Biomaterials*, 2000, 21(18): 1879-1885.
- [10] Dubey V, Mishra D, Dutta T, et al. Dermal and transdermal delivery of an anti-psoriatic agent via ethanolic liposomes [J]. *J Controlled Release*, 2007, 123(2): 148-154.
- [11] López-Pinto J M, González-Rodríguez M L, Rabasco A M. Effect of cholesterol and ethanol on dermal delivery from DPPC liposomes [J]. *Int J Pharm*, 2005, 298(1): 1-12.
- [12] Dubey V, Mishra D, Jain N K. Melatonin loaded ethanolic liposomes: Physicochemical characterization and enhanced transdermal delivery [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2007, 67(2): 398-405.