

水溶性帕利哌酮前体药物的合成及其体外透皮研究

顾 薇^{1,2}, 王晨慧², 刘小卫², 周 焯², 包小峰², 陈 勇^{2*}

1. 南通市第二人民医院 临床药学部, 江苏 南通 226002

2. 南通大学 药学院, 江苏 南通 226001

摘要: 目的 合成帕利哌酮 (PPD) 的水溶性前体药物, 使其能通过离子导入技术快速透过皮肤。方法 合成 PPD 的水溶性前体药物, 即 PPD 的 β -丙氨酸酯 (PPD- β -Ala), 并对前药进行结构确证; 利用高效液相色谱 (HPLC) 建立 PPD 及 PPD- β -Ala 的定量分析方法, 并进行方法学验证; 测定 PPD 及 PPD- β -Ala 的饱和溶解度, 并对 PPD- β -Ala 的脂水分配系数 ($P_{o/w}$) 和 pKa 进行考察; 进行 PPD- β -Ala 体外透皮实验, 包括被动透皮吸收和离子导入透皮研究; 在体外离子导入研究中, 考察给药池介质 [纯水、HEPES 溶液 (pH 5.5) 或 HEPES 溶液 (pH 6.5)]、给药池药物浓度 (10、20、30 mmol·L⁻¹) 和电流密度 (0.1、0.3、0.5 mA·cm⁻²) 对 PPD- β -Ala 透皮递送量的影响。结果 前体药物 PPD- β -Ala 结构通过核磁共振氢谱得以确证。建立的 HPLC 法可对 PPD 及 PPD- β -Ala 同时检测, 方法专属性、精密度和检测限均满足实验要求。PPD- β -Ala 在纯水中的饱和溶解度为 33.46 mmol·L⁻¹, 远高于 PPD 的水溶解度; PPD- β -Ala 的 lg $P_{o/w}$ 小于 PPD; PPD- β -Ala 可充分质子化, 带 1 个正电荷, PPD 不具备易解离或易质子化的基团。PPD- β -Ala 不易透皮吸收, 但在离子导入条件下可在接收池中检出大量 PPD- β -Ala, 如在施加电流 0.5 mA·cm⁻² 条件下, 当给药池中 PPD- β -Ala 的浓度为 30 mmol·L⁻¹ 时, 7 h 后的累积透皮递送量可达 250 nmol·cm⁻²。所选给药池介质的变化未对 PPD- β -Ala 的累积透皮递送量产生明显改变, 但给药池药物浓度和电流强度的增加均能提高 PPD- β -Ala 的累积透皮递送量。在体外离子导入研究各组中均发现大量的 PPD 和 PPD- β -Ala 蓄积于皮肤, 以 0.5 mA·cm⁻² 电流强度、给药池药物浓度为 20 mmol·L⁻¹ (HEPES 溶液为介质, pH 5.5) 的给药条件为例, 蓄积于皮肤中的 PPD 和 PPD- β -Ala 的量分别可达 (144.21±41.73)、(890.61±106.40) nmol·cm⁻²。结论 水溶性离子化的 PPD 前药 PPD- β -Ala 可在离子导入过程中通过电迁移作用快速透皮, 理论上可利用尺寸适中的离子导入透皮贴片满足 PPD 的最小日给药剂量。

关键词: 帕利哌酮; 透皮给药; 离子导入; 水溶性前药; 精神分裂症

中图分类号: R944.9 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2022) 10-2008-09

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2022.10.010

Synthesis of a water-soluble prodrug of paliperidone and investigation into its transdermal delivery *in vitro*

GU Wei^{1,2}, WANG Chenhui², LIU Xiaowei², ZHOU Ye², BAO Xiaofeng², CHEN Yong²

1. Department of Clinical Pharmacy, The Second People's Hospital of Nantong, Nantong 226002, China

2. School of Pharmacy, Nantong University, Nantong 226001, China

Abstract: **Objective** To synthesize a water-soluble prodrug of paliperidone (PPD) in order to make it rapidly penetrate the skin by iontophoresis. **Methods** The water-soluble prodrug of PPD, i.e., β -alanine ester of PPD (PPD- β -Ala), was synthesized, and the structure of the prodrug was confirmed. The analytical method to quantify PPD and PPD- β -Ala was developed by high performance liquid chromatography (HPLC), and the method was validated. The saturated solubility of PPD and PPD- β -Ala was determined, and the oil-water partition coefficient ($P_{o/w}$) and pKa of PPD- β -Ala were investigated. Transdermal delivery of PPD- β -Ala was investigated *in vitro*, including passive and iontophoretic transdermal delivery studies. In the iontophoretic study, the effects of matrix [pure water, HEPES solution (pH 5.5) or HEPES solution (pH 6.5)] in the donor compartment, the drug concentration (10, 20, and 30 mmol·L⁻¹) in donor compartment and the current density (0.1, 0.3, and 0.5 mA·cm⁻²) applied on the transdermal delivery of PPD- β -Ala were investigated *in vitro*. **Results** The structure of PPD- β -Ala was confirmed by proton magnetic resonance

收稿日期: 2022-03-28

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81603044)

第一作者: 顾 薇 (1991—), 女, 本科, 初级药师, 研究方向为医院药学。Tel: 18862957229 E-mail: 1663709145@qq.com

*通信作者: 陈 勇 (1983—), 男, 副教授, 研究方向为工业药剂学。Tel: 18911617152 E-mail: scuchen2003@163.com

spectroscopy. The analytical method using HPLC can simultaneously quantify PPD and PPD- β -Ala, and the method specificity, precision and limit of detection meet the experimental requirements. The saturated solubility of PPD- β -Ala in pure water was approximately $33.46 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, which was much higher than that of PPD. The $\lg P_{\text{o/w}}$ of PPD- β -Ala was less than that of PPD. PPD- β -Ala can be fully protonated and has a positive charge. PPD has no easily dissociated or protonated groups. PPD- β -Ala was not well absorbed via the skin, but appreciable amounts of PPD- β -Ala can be detected in the receiver compartment under iontophoresis. For example, the cumulative transdermal delivery of PPD- β -Ala could reach $250 \text{ nmol} \cdot \text{cm}^{-2}$ when a current of $0.5 \text{ mA} \cdot \text{cm}^{-2}$ was applied in the donor compartment containing $30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ of PPD- β -Ala for 7 h. The selected media in donor compartment did not impact the cumulative delivery of PPD- β -Ala significantly, but the increase in applied drug concentration and current intensity could enhance the cumulative delivery of PPD- β -Ala. It was found that appreciable amounts of PPD and PPD- β -Ala were deposited in the skin in each group. For example, the amount of PPD and PPD- β -Ala retained in the skin attained (144.21 ± 41.73) and $(890.61 \pm 106.40) \text{ nmol} \cdot \text{cm}^{-2}$, respectively, when a current of $0.5 \text{ mA} \cdot \text{cm}^{-2}$ was applied in the donor compartment containing $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ of PPD- β -Ala (HEPES solution as medium, pH 5.5) for 7 h. **Conclusion** The water-soluble, ionizable PPD prodrug, i.e., PPD- β -Ala, can rapidly penetrate the skin by electromigration effect during iontophoresis. In theory, an iontophoretic transdermal patch with moderate size can be used to deliver minimum daily dose of PPD.

Key words: paliperidone; transdermal drug delivery; iontophoresis; water-soluble prodrug; schizophrenia

精神分裂症(SZ)是一组常见的病因未明的高致残性精神疾病,病程多迁延,对患者及其家庭造成沉重负担。大多数SZ患者生活在社区,使用抗精神病药物进行维持治疗以预防复发至关重要^[1]。由于SZ患者对定时口服药物的依从性不高,这在一定程度上促进了长效制剂的研发。例如,棕榈帕利哌酮酯注射液(3M)(善妥达[®])只需每3个月im 1次,阿塞那平透皮贴剂(Secuado[®])和布南色林透皮贴剂(Lonasen[®])也只需每24小时给药1次。帕利哌酮(PPD)是利培酮的活性代谢产物,适用于精神分裂症急性期的治疗。除长效注射剂型外,目前国内还批准了PPD口服缓释片剂。本课题组设想,由于PPD缓释片剂的最小规格仅为1.5 mg,最大规格也只有9 mg,从给药剂量来看,似有被制成透皮贴剂的可能性。但是PPD相对分子质量较大(426.48),不利于透皮吸收。

离子导入技术(ION)是利用直流电流,以同电性相斥的原理,将离子型药物或荷电的药物粒子经电极导入皮肤,进入皮下组织或体循环的方法^[2]。电迁移和电渗是药物ION过程中的主要驱动机制:电迁移和电渗分别促进荷电分子和中性分子的定向迁移,但电渗的作用远弱于电迁移^[3]。对于PPD这种难溶性的中性分子,直接使用ION促进递送的效果可能不明显。因此,可考虑开发一种基于PPD前药结合ION的透皮给药系统^[4]:首先,将PPD制成水溶性更强且在中性pH条件下更易离子化的PPD氨基酸酯前药,再通过ION将PPD氨基酸酯前药导入体内,并在递送过程中释放出原药PPD发挥药效。

1 材料

1.1 主要仪器

AVANCE III HD 400M型核磁共振波谱仪(美国Bruker公司);LC-10AT型高效液相色谱(HPLC)仪和UV-2550型紫外-可见分光光度计(日本Shimadzu公司);pHS-25型实验室pH计(上海仪电科学仪器股份有限公司);DF-101S型集热式恒温加热磁力搅拌器(河南巩义予华仪器有限公司);APH 1000 M型直流电源(美国Kepco公司);立式Franz扩散池由南通科华玻璃仪器有限公司定做,有效扩散面积为 2.0 cm^2 ;Thomas Stadie-Riggs型真皮刀组件(美国Thomas Scientific公司);RE-52AA型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);HZS-H型恒温水浴振荡器(哈尔滨东联电子技术开发有限公司);TGL-16B型高速离心机(上海安亭科学仪器厂);Milli-Q Advantage A10型超纯水仪(美国Millipore公司);聚氯乙烯(PVC)管(内径3 mm、外径5 mm,上海道冠橡塑五金有限公司)。

1.2 主要试剂

PPD原料药(湖北威德利化学科技有限公司,批号20190601,质量分数>99%);N,N'-二异丙基碳二亚胺(DIC,上海阿达玛斯试剂有限公司);Boc- β -丙氨酸(Boc- β -Ala-OH,上海毕得医药科技股份有限公司);4-二甲氨基吡啶(DMAP)、4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES)、三氟乙酸(TFA)和琼脂糖均购自上海麦克林公司;银丝(Ag, Sigma-Aldrich公司);氯化银(AgCl,南京化学试剂股份有限公司);色谱级甲醇(美国TEDIA试剂公司);柱色谱硅胶(粒径100~200目,青岛海洋化工厂);其他试剂均为分析

纯,水为超纯水。

1.3 动物

雄性尤卡坦猪(仅购买新鲜猪耳朵),体质量为100~150 kg,购自南通市港闸区永兴生猪厂,动物防疫条件合格证号为(苏通)动防合字第20180151号。

2 方法与结果

2.1 PPD前体药物的合成

参照文献报道^[4-5]合成PPD的前体药物 β -丙氨酸酯(PPD- β -Ala)。将DIC 0.296 g和Boc- β -Ala-OH 0.332 7 g溶于二氯甲烷(DCM)15 mL中,在30 °C水浴下磁力搅拌2 h,滴加至溶有PPD 0.50 g和DMAP 0.03 g的15 mL同温DCM溶液中。该混合溶液在30 °C水浴下磁力搅拌过夜。薄层色谱(TLC)

监测反应至完毕,展开剂为DCM-甲醇-冰乙酸15:1:0.25。在50 °C水浴下旋转蒸发除去溶剂,粗产物使用硅胶柱色谱纯化,流动相比比例为DCM-甲醇-冰乙酸15:1:0.25。收集产物所在的洗脱液,旋转蒸发除去溶剂。产物用醋酸乙酯复溶,并用饱和NaHCO₃溶液(30 mL)和饱和NaCl溶液(30 mL)各洗涤2次。洗涤之后的有机相用无水硫酸钠干燥,滤过,滤液旋转蒸发除去溶剂,得中间产物PPD-Boc- β -Ala。冰浴条件下,将中间产物依次与DCM 5 mL和TFA 5 mL混合,磁力搅拌2 h,旋转蒸发除去溶剂,得目标产物PPD- β -Ala(游离碱)(合成路线见图1),收率58.4%。使用HPLC-UV检测纯度(方法见“2.3.1”项下),经峰面积归一化法计算,PPD- β -Ala的质量分数为98.8%。

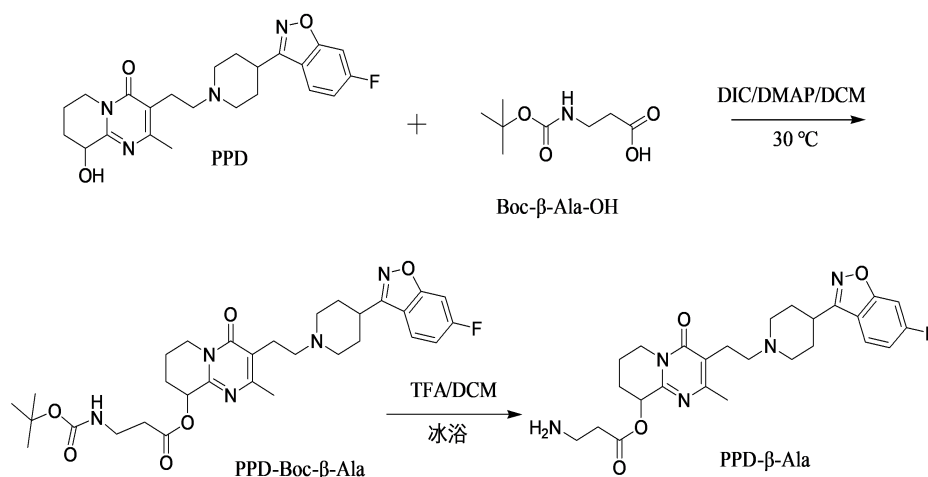


图1 PPD- β -Ala的合成路线

Fig. 1 Synthetic scheme of PPD- β -Ala

2.2 PPD及PPD前体药物的确证

通过核磁共振氢谱(¹H-NMR)确证PPD及PPD- β -Ala的结构。¹H-NMR谱图中各信号峰的归属如下:

PPD: ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ : 1.74~1.93(m, 5H), 1.97~2.09(m, 3H), 2.15(t, *J*=11.7, 2.4 Hz, 2H), 2.27(s, 3H), 2.40(t, *J*=7.7 Hz, 2H), 2.60~2.66(m, 2H), 3.04(t, *J*=11.7 Hz, 2H), 3.14(m, *J*=11.7, 3.8 Hz, 1H), 3.67(t, *J*=14.1, 8.5, 5.2 Hz, 1H), 3.91(d, *J*=14.7, 5.2 Hz, 1H), 4.45(q, *J*=4.7 Hz, 1H), 5.70(d, *J*=4.6 Hz, 1H), 7.28(t, *J*=9.1, 2.2 Hz, 1H), 7.69(d, *J*=9.1, 2.2 Hz, 1H), 8.02(dd, *J*=8.8, 5.3 Hz, 1H)。

PPD- β -Ala: ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ : 1.74~1.95 (m, 5H), 2.01~2.16 (m, *J*=8.0 Hz, 3H), 2.20(t, 2H), 2.31 (m, 3H), 2.40(m, 2H), 2.65(m, 2H), 3.10 (s, *J*=6.4 Hz, 2H), 3.14~3.27(m, 5H), 3.71(t, *J*=12.8, 3.6 Hz, 1H), 3.93 (d, *J*=14.0, 5.2 Hz, 1H),

5.76 (d, *J*=6 Hz, 1H), 7.30 (t, *J*=8.8, 2.0 Hz, 1H), 7.70 (d, *J*=8.8, 2.0 Hz, 1H), 8.02 (dd, *J*=8.8, 5.2 Hz, 1H)。

2.3 PPD及PPD- β -Ala含量的测定

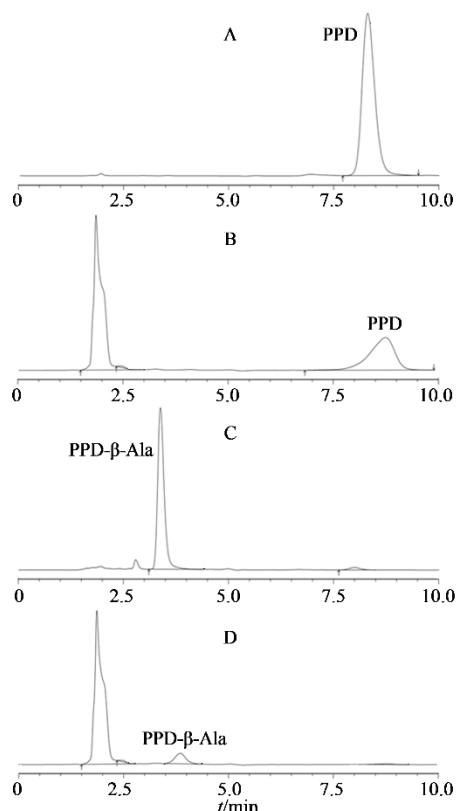
2.3.1 检测条件 精密称取PPD、PPD- β -Ala适量,分别置于25 mL量瓶中,加入甲醇溶解,定容,得浓度为100 μ mol·L⁻¹的样品溶液,在200~400 nm波长范围内进行紫外光谱扫描。结果显示,PPD、PPD- β -Ala均在237和279 nm处呈现特征吸收峰,将波长237 nm选定为后续PPD、PPD- β -Ala定量分析的紫外吸收最大波长。

采用HPLC-UV对PPD和PPD- β -Ala同时进行定量。色谱条件:色谱柱为Diamonsil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μ m);保护柱为EasyGuard C₁₈保护柱(10 mm×4.0 mm, 5 μ m);流动相:A相为20 mmol·L⁻¹磷酸(NaOH调pH至3.1),B相为甲醇,A:B=60:40;检测波长为237 nm;体积流量为1 mL·min⁻¹;进样量为20 μ L;柱温为30 °C。

2.3.2 样品配制 (1)空白皮肤提取液:将新鲜小猪皮肤(按“2.5”项下皮肤处理方法操作所得)剪碎,置于玻璃瓶中,加入流动相,置于磁力搅拌器上搅拌1 h,经0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得空白皮肤提取液样品;(2)供试品溶液:分别精密称取PPD或PPD- β -Ala适量于量瓶中,用流动相溶解并制成浓度均为200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的贮备液。分别精密量取上述各贮备液适量,以流动相稀释成浓度分别为100、50、25、10、5、2、0.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的系列供试品溶液。

2.3.3 方法学考察 按生物样品定量分析方法验证指导原则进行方法学考察^[6]。取PPD和PPD- β -Ala的供试品溶液以及加入了PPD和PPD- β -Ala供试品溶液的空白皮肤提取液,按“2.3.1”项下的色谱条件测定,记录专属性色谱图。专属性实验结果显示,空白皮肤对PPD或PPD- β -Ala的测定均无干扰,提示本方法专属性良好,色谱图见图2。

以待测物峰面积为纵坐标(Y),浓度为横坐



A-PPD供试品溶液;B-加入了PPD供试品溶液的空白皮肤提取液;
C-PPD- β -Ala供试品溶液;D-加入了PPD- β -Ala供试品溶液的空白
皮肤提取液

A-test solution of PPD; B-blank skin extraction solution spiked with
test solution of PPD; C-test solution of PPD- β -Ala; D-blank skin ex-
traction solution spiked with test solution of PPD- β -Ala

图2 PPD及PPD- β -Ala的专属性HPLC谱图

Fig. 2 HPLC chromatograms of PPD and PPD- β -Ala in
specificity experiments

标(X)进行线性回归,得到PPD的线性方程为 $Y=15\,652 X+704.52(r=0.999\,9)$,PPD- β -Ala的线性方程为 $Y=2\,328.4 X-3\,120(r=0.999\,7)$,各化合物均在0.5~200.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度与其峰面积呈良好线性关系,定量下限均为0.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

取定量下限(0.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)和低、中、高浓度(5、50、200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)PPD和PPD- β -Ala的样品溶液各6份,按“2.3.1”项下的色谱条件测定各样品,每个样品重复进样3次,连续3 d进样,记录峰面积,并计算出PPD及PPD- β -Ala浓度,即可计算得日内和日间精密度。日内、日间精密度试验的RSD均小于2%($n=6$)、准确度(实际浓度/理论浓度)为96.87%~102.46%(RSD<2%, $n=6$),提示方法的精密度和准确度均较好。

按“2.5”项下方法处理皮肤,将皮肤的真皮侧朝上,在皮肤真皮侧分别滴加400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的PPD或PPD- β -Ala甲醇溶液各100 μL 。在室温下放置直至溶剂挥干。将皮肤剪碎,分别加入5 mL甲醇,磁力搅拌提取12 h。搅拌结束后,提取液经微孔滤膜(0.45 μm)滤过,取续滤液,按“2.3.1”项下的色谱条件测定提取液中的药物浓度。结果表明,各待测物的提取回收率均超过95%(RSD<5%, $n=6$)。

2.4 理化性质研究

2.4.1 脂水分配系数($P_{o/w}$)的测定 将正辛醇与蒸馏水置于37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴摇床中振荡24 h至相互饱和,静置分层分别收集两相。称取适量PPD- β -Ala溶于2 mL水饱和的正辛醇相中,再加入2 mL正辛醇饱和的水相。将混合物置于37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴振荡器中振摇24 h,离心分离两相,分别取两相适量,用“2.3.1”项下的流动相适当稀释后,按“2.3.1”项下条件进样测定,记录峰面积并代入线性方程,计算PPD- β -Ala的浓度,再根据样品的稀释倍数计算其在各相中的实际浓度,实验平行开展3份。计算 $P_{o/w}$ 及 $\lg P_{o/w}$ 。

$$P_{o/w} = C_o/C_w$$

C_o 为在水饱和的正辛醇溶液中PPD- β -Ala的浓度, C_w 为在正辛醇饱和的水中PPD- β -Ala的浓度

测得PPD- β -Ala的 $\lg P_{o/w}$ 值为 1.38 ± 0.05 ,小于PPD的 $\lg P_{o/w}$ 值(2.32)^[7]。

2.4.2 饱和溶解度的测定 分别在纯水、HEPES溶液(10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 5.5和6.5)和含30% PEG 400的生理盐水溶液中测定PPD和PPD- β -Ala的饱和溶解度。操作方法如下:分别将过量的PPD和PPD- β -Ala加入至上述溶液中,恒温水浴振荡(37 $^{\circ}\text{C}$ 、

100 r·min⁻¹)24 h, 分别取各混悬液以 12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液, 用微孔滤膜(0.45 μm)滤过, 续滤液用“2.3.1”项下的流动相适当稀释(稀释倍数根据预试验确定, 以保证测定结果在线性范围内为标准)后, 分别按“2.3.1”项下条件进样测定, 记录峰面积并代入线性方程, 计算 PPD 和 PPD-β-Ala 的浓

度, 再根据各样品的稀释倍数计算其饱和溶解度。实验平行 3 份。

结果如表 1 所示, 相比 PPD, PPD-β-Ala 在 4 种介质中的溶解度都有不同程度的提高, 其中, PPD 及 PPD-β-Ala 在含 30% PEG 400 的生理盐水溶液中的溶解度最高。

表 1 PPD 及 PPD-β-Ala 在不同水溶液中的饱和溶解度($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 1 Saturated solubility of PPD and PPD-β-Ala in different aqueous solutions ($\bar{x} \pm s, n=3$)

化合物	饱和溶解度/(mmol·L ⁻¹)			
	纯水	HEPES 溶液(pH 5.5)	HEPES 溶液(pH 6.5)	含 30% PEG 400 生理盐水溶液
PPD	0.57±0.04	2.07±0.09	1.85±0.08	32.39±3.37
PPD-β-Ala	33.46±1.83	34.23±2.47	41.51±2.06	56.48±1.92

2.4.3 pKa 的计算 使用 ACD/ChemSketch 软件(ACD/Labs)计算 PPD-β-Ala 的 pKa 值。PPD-β-Ala 的伯氨基的 pKa 值为 8.5。根据 Henderson-Hasselbalch 方程:

$$\text{pH} = \text{pKa} + \lg[\text{B}]/[\text{BH}^+]$$

得不同 pH 条件下 PPD-β-Ala 的分子荷电数量, 绘图。如图 3 所示, 在 pH 值处于皮肤可以接受的弱酸及中性条件下, 每个 PPD-β-Ala 分子可充分质子化, 荷 1 个正电荷。PPD 难溶, 且不具备易解离或易质子化的基团。

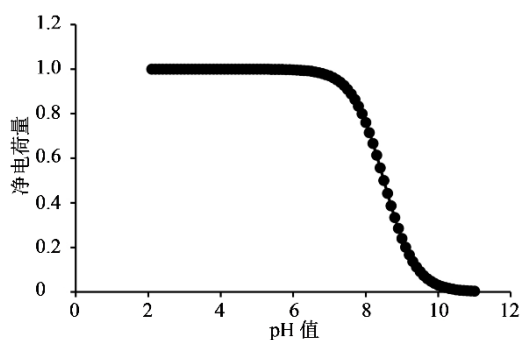


图 3 根据 Henderson-Hasselbalch 方程计算得到的 PPD-β-Ala 分子荷电数随 pH 值的变化

Fig. 3 Net charge number of PPD-β-Ala molecule with change of pH value, calculated according to Henderson-Hasselbalch equation

2.5 体外被动透皮吸收

使用新鲜猪皮和立式 Franz 扩散池进行透皮实验。用手术刀将新鲜猪耳外侧皮肤剥离, 于 -20 °C 冰箱中冷冻保存(保存时间不超过 1 个月), 备用。实验前, 将猪皮置于 0.9% 氯化钠溶液中解冻约 10 min, 以滤纸吸去多余水分, 然后剔除猪毛, 剪成直径约为 3 cm 的圆形皮肤样本, 再用真皮刀削去脂肪及部分真皮组织, 最终得厚度约为 1 mm 的皮肤

样本。将处理好的皮肤样本紧密固定在给药池和接收池之间(扩散面积为 2 cm²), 接收池中加入含 30% PEG 400 的生理盐水溶液 12 mL, 恒速(200 r·min⁻¹)搅拌; 接收池外水浴温度保持在 32 °C。给药池中加入 PBS 缓冲液(pH 7.4)1 mL, 平衡 30 min 后移除, 用 1 mL 纯水洗涤 2 次。精密称取 PPD-β-Ala 适量, 溶于 HEPES 溶液(pH 5.5)中, 得到浓度为 20 mmol·L⁻¹ 的药物溶液。向给药池中加入该 PPD-β-Ala 溶液 1 mL, 开始计时, 每小时经取样臂取样 0.8 mL, 同时迅速补充等体积的同种新鲜接收液。所有样品不经稀释, 按“2.3.1”项下条件进样测定, 记录峰面积并代入线性方程, 计算 PPD 和 PPD-β-Ala 的浓度, 再计算相应的累积透皮扩散量。透皮实验持续 7 h, 待末次取样后, 拆除实验装置, 取下皮肤。皮肤表面用流水冲洗 10 s, 吸干残留水分, 用剪刀将皮肤剪碎, 加入 20 mL 甲醇后搅拌 12 h, 取提取液, 用微孔滤膜(0.45 μm)滤过, 续滤液用“2.3.1”项下的流动相适当稀释(稀释倍数根据预试验确定, 以保证测定结果在线性范围内为标准)后, 按“2.3.1”项下条件进样测定, 记录峰面积并代入线性方程, 计算 PPD 和 PPD-β-Ala 的浓度, 再根据各样品的稀释倍数计算其皮肤蓄积量。体外被动透皮实验平行开展 6 份。

在接收池中均无 PPD 或 PPD-β-Ala 被检出, PPD 和 PPD-β-Ala 的皮肤蓄积量分别为(38.77±5.83)、(50.20±1.34)nmol·cm⁻²。

2.6 体外离子导入透皮吸收

在“2.5”项下体外被动透皮实验装置基础上构建离子体外导入透皮实验装置, 装置图见图 4。阳极池内盛 PBS 缓冲液(pH 7.4)20 mL, 将 Ag 电极和 AgCl 电极分别插入阳极池和阴极池(即接收池)。

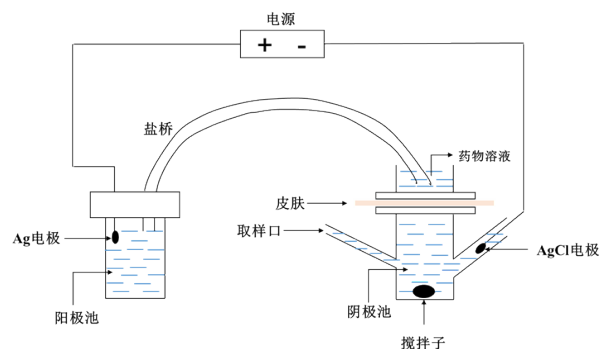


图4 离子导入透皮装置示意图

Fig. 4 Schematic diagram of transdermal iontophoresis

为降低离子导入过程中的同离子竞争,用盐桥(0.3%琼脂糖溶于0.1 mol·L⁻¹氯化钠溶液固化形成)连通物理分隔的阳极池和给药池。给药池经PBS缓冲液平衡后,将PPD-β-Ala溶液1 mL加入给药池中。开启电流,按“2.5”项下方法自接收池取样,并在7 h透皮实验完毕后提取皮肤中的药物。按“2.3.1”项下条件进样测定,记录峰面积并代入线性方程,计算PPD和PPD-β-Ala的浓度,再计算相应的累积透皮扩散量和皮肤蓄积量。体外离子导入透皮实验平行开展6份。采用Excel 2007进行统计分析,组间比较采用Student *t*检验。

(1)考察给药池介质:精密称取PPD-β-Ala适量,分别溶于纯水、HEPES溶液(pH 5.5)或HEPES溶液(pH 6.5)中,得到一系列浓度均为20 mmol·L⁻¹的含药溶液,施以0.5 mA·cm⁻²的电流强度,进行实验。

给药池不同介质的影响结果如图5所示,使用离子导入时,PPD-β-Ala的累积透皮递送量相对于其被动透皮吸收有较大增加:分别以纯水、HEPES溶液(pH 5.5)和HEPES溶液(pH 6.5)为给药池介质时,PPD-β-Ala的累积透皮递送量分别可达(130.55±51.30)、(134.30±23.30)、(125.69±46.21) nmol·cm⁻²,组间统计无显著性差异,显示所选介质对离子导入无明显影响;与此同时,在接收池中还检测出PPD,显示一部分PPD-β-Ala在透皮递送过程中经皮肤水解酶水解为原型药物PPD。

(2)考察给药池药物浓度:精密称取PPD-β-Ala适量,溶于HEPES溶液(pH 5.5),得到浓度分别为10、20、30 mmol·L⁻¹的含药溶液。施以0.5 mA·cm⁻²的电流强度,进行实验。

给药池药物浓度的影响结果如图6所示,电流强度不变,当PPD-β-Ala溶液中药物浓度

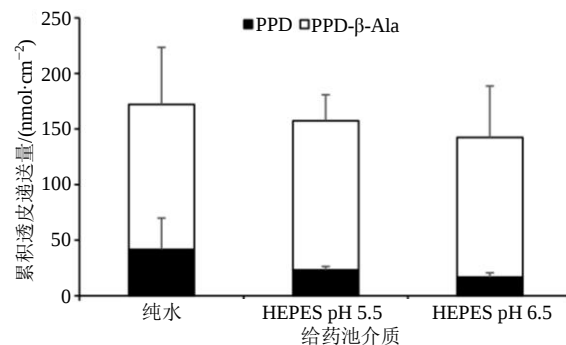


图5 给药池介质对PPD-β-Ala累积透皮递送量的影响

Fig. 5 Effect of media in donor compartment on cumulative delivery of PPD-β-Ala

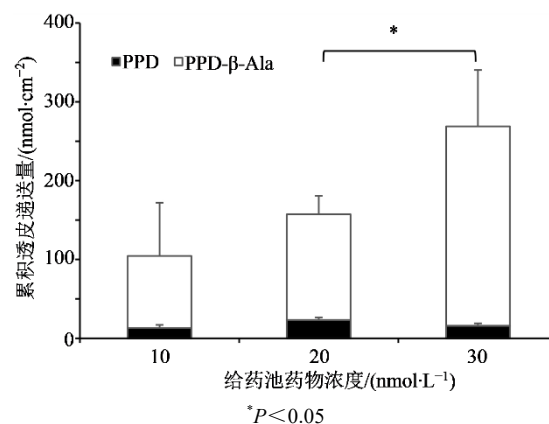


图6 给药池药物浓度变化对PPD-β-Ala累积透皮递送量的影响

Fig. 6 Effect of drug concentration on cumulative delivery of PPD-β-Ala

从10 mmol·L⁻¹升高至20和30 mmol·L⁻¹时,PPD-β-Ala的累积透皮递送量自(91.70±67.45) nmol·cm⁻²升高至(134.30±23.30)、(252.95±71.65) nmol·cm⁻²,显示PPD-β-Ala的累积透皮递送量与给药池药物浓度呈正相关。接收池中也发现了少量的水解形成的PPD。给药池药物浓度为10和20 mmol·L⁻¹时的PPD-β-Ala累积透皮递送量无统计学差异,但20和30 mmol·L⁻¹时的累积透皮递送量有统计学差异(*P* < 0.05)。

(3)考察电流强度:精密称取PPD-β-Ala适量,溶于HEPES溶液(pH 5.5),得到浓度为20 mmol·L⁻¹的含药溶液。分别施以0.1、0.3、0.5 mA·cm⁻²的电流强度,进行实验。

电流强度的影响结果如图7所示,给药池药物浓度不变,当电流强度从0.1 mA·cm⁻²升至0.3、0.5 mA·cm⁻²时,PPD-β-Ala的累积透皮递送量自(68.84±28.32) nmol·cm⁻²升高至(82.42±31.07)和(134.30±23.30) nmol·cm⁻²,显示PPD-β-Ala的累积透皮递送量与电流强度呈正相关。电流强度为

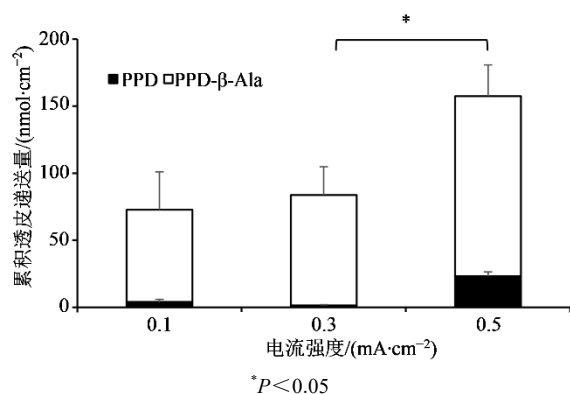


图7 电流强度对PPD-β-Ala累积透皮递送量的影响

Fig. 7 Effect of current intensity on cumulative delivery of PPD-β-Ala

0.1、0.3 mA·cm⁻²时的PPD-β-Ala累积透皮递送量无统计学差异,但0.3和0.5 mA·cm⁻²时的累积透皮递送量有统计学差异($P < 0.05$)。

经7 h体外离子导入PPD-β-Ala后,离体皮肤中可蓄积大量PPD和PPD-β-Ala。以0.5 mA·cm⁻²电流强度、给药池药物浓度为20 mmol·L⁻¹(HEPES溶液为介质,pH 5.5)的给药条件为例,蓄积于皮肤中的PPD和PPD-β-Ala的量分别可达(144.21 ± 41.73)、(890.61 ± 106.40) nmol·cm⁻²。

3 讨论

透皮给药是将药物施用于完整皮肤表面,使药物透过皮肤屏障被递送进入血液循环系统而起到全身作用。与口服或注射剂型相比,透皮给药是一种非侵入性的给药方式,具有可以避免肝脏首关效应、避免胃肠道代谢、延长有效作用时间及稳定血药浓度的优势。同时,可改善患者的顺应性,尤其是改善一些自主行为不受控制的患者采用传统给药方式困难大、风险高的情况^[8],因此在神经精神类药物的长效给药中有不少成功的应用,例如治疗阿尔茨海默病的卡巴拉汀贴剂、多奈哌齐贴剂,治疗帕金森病的罗替高汀贴剂,以及治疗精神分裂症的阿塞那平贴剂、布南色林贴剂等。利培酮和其活性代谢产物PPD的透皮给药系统目前也处于研究中^[9-10]。PPD的相对分子质量较大,且水溶性差,被动透皮较困难,需要通过一些促渗技术促进其透皮吸收。本研究利用PPD结构上暴露的9-位羟基,首次合成了水溶性的PPD前体药物,即PPD-β-Ala,通过¹H-NMR对其结构进行了确证:PPD与PPD-β-Ala均给出明确的¹H信号归属,在PPD-β-Ala的谱图中没有PPD谱图中-OH的¹H信号(δ 4.45 × 10⁻⁶),还观察到PPD-β-Ala谱图中紧邻酯键的-CH结构中的

去屏蔽作用:PPD δ 5.70 × 10⁻⁶, PPD-β-Ala δ 5.76 × 10⁻⁶,这是由于新形成的酯键的吸电子作用所致。本课题组前期研究显示,将PPD与α-氨基酸酯化所形成的PPD-α-氨基酸酯体外极不稳定,这可能由于在这类分子的空间构象中,氨基距酯键较近而产生了分子内催化降解^[5];因此,本研究选择了用β-丙氨酸和PPD成酯,证实了产物PPD-β-Ala有较高的体外稳定性^[11]。

理化性质研究表明PPD-β-Ala具有比PPD高得多的水溶性,这主要是因为分子中引入了在生理pH范围内易离子化的基团。为保证透皮递送研究中接收池的漏槽条件,通过溶解度对比研究选择了对PPD和PPD-β-Ala均具有较高溶解度的含30% PEG 400的生理盐水作为接收池溶液。体外被动透皮研究显示,虽然PPD-β-Ala的lg *P*值(1.38)符合药物被动透皮的经验规则(化合物lg *P*值介于1~3)^[12],且给药池中药物浓度已较高(20 mmol·L⁻¹),但直至透皮研究结束,接收池中PPD和PPD-β-Ala的浓度依然在检测限以下,说明PPD-β-Ala较高的相对分子质量(497.6)不利于其透过角质层屏障;与之相比,透皮离子导入PPD-β-Ala可在接收池中检出大量PPD-β-Ala,并因为β-丙氨酸酯也可被皮肤水解酶水解^[13],所以也在接收池中检出了PPD-β-Ala的水解产物PPD。

给药池介质对药物透皮离子导入的影响是复杂的,因为在改变介质时,介质内的pH值、竞争性离子浓度以及溶液中总离子强度均会产生改变^[13];另外,给药池介质pH值不同,也改变了皮肤中蛋白质中的羧基解离的比例,从而可能对离子导入条件下的皮肤透过选择性有所影响^[14]。上述情况均决定了累积透皮递送量必然是多重因素共同作用的结果,这可能是在本研究中改变给药池介质后PPD-β-Ala的累积透皮递送量未发生明显改变的原因。给药池药物浓度的改变通常会引起离子导入过程中累积透皮递送量的变化,两者一般呈正相关,但不一定呈正比,这主要取决于荷电药物离子在电场作用下进行电迁移作用的难易程度,即取决于电子传递效率^[13];在对给药池PPD-β-Ala浓度的研究中,除了上述影响因素,还受到PPD-β-Ala分子本身的影响:PPD-β-Ala进入皮肤后,一部分会被水解为PPD,从而丧失电迁移能力,水解后得到的PPD仅能通过电渗作用缓慢移动^[14];当给药池中PPD-β-Ala浓度较高时,而皮肤水解酶水解能力有限,因此理论上会有更大部分的PPD-β-Ala未在皮肤中水解,从

而借助电迁移效应迅速抵达接收池^[4],表现出更高的累积透皮递送量,这可以解释给药池 PPD- β -Ala 的浓度为 $30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,累积透皮递送量呈现显著性增长。离子导入的电流强度变化经常会成比例地改变离子导入药物透皮递送速率^[13]。在本研究中,当电流强度从 $0.3 \text{ mA} \cdot \text{cm}^{-2}$ 升至 $0.5 \text{ mA} \cdot \text{cm}^{-2}$ 时,PPD- β -Ala 的累积透皮递送量从 $82 \text{ nmol} \cdot \text{cm}^{-2}$ 成比例升至 $134.30 \text{ nmol} \cdot \text{cm}^{-2}$,基本符合规律。但当电流强度从 $0.1 \text{ mA} \cdot \text{cm}^{-2}$ 升至 $0.3 \text{ mA} \cdot \text{cm}^{-2}$ 时,PPD- β -Ala 的累积透皮递送量变化不显著,推测仍有可能是皮肤水解酶在 PPD- β -Ala 皮肤内转运过程中对其部分水解所致。相较改变给药池药物浓度或电流强度时 PPD- β -Ala 的累积透皮递送量呈现一定的规律性变化,PPD 的累积透皮递送量的变化不规律;其原因可能在于扩散实验中皮肤厚度的轻微差异以及猪耳皮肤中不同部位所表现的皮肤水解酶的活性差异所导致。离体皮肤厚度稍厚或者皮肤中水解酶活性较低,均可能导致扩散池中 PPD 的量降低。

在施加电流 $0.5 \text{ mA} \cdot \text{cm}^{-2}$ 条件下,当给药池中 PPD- β -Ala 的浓度为 $30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,7 h 后的累积透皮递送量可达 $250 \text{ nmol} \cdot \text{cm}^{-2}$ 。若假设这些前药在体内环境中均能有效水解成 PPD,则理论上可在该时间段内递送 PPD $> 100 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$;也就是说,当使用 $4 \text{ cm} \times 4 \text{ cm}$ 的离子导入贴剂时,理论上可在 7 h 内大体满足 PPD 最小日给药剂量 1.5 mg 的透皮递送,且电流强度不超过一般认为的皮肤安全阈值 $0.5 \text{ mA} \cdot \text{cm}^{-2}$ 。考虑到皮肤中发现了大量的 PPD 和 PPD- β -Ala 蓄积,这意味着关闭电流后,皮肤中蓄积的药物仍可能以一定速率缓慢释放进入血液^[15]。

本研究通过合成水溶性离子化 PPD 前体药物 PPD- β -Ala,在离子导入条件下,初步实现了药物的快速透皮递送,改善了 PPD 难以透皮的问题。后续工作将开展基于大鼠的 PPD- β -Ala 透皮离子导入研究,以期进一步研究 PPD- β -Ala 在体透皮转运速率和体内转化特征。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 刘孟斯, 韩鸿璨, 孙春萌. 非口服缓控释制剂在精神分裂症治疗中的应用及其研发的一般思考 [J]. 中国临床药理学杂志, 2021, 37(10): 1255-1260, 1265.
- [2] Singhal M, Serna C, Merino V, et al. Current profile controlled transdermal delivery of pramipexole from an iontophoretic patch system *in vitro* and *in vivo* [J]. Eur J Pharm Biopharm, 2021, 166: 175-181.
- [3] Gratieri T, Kalia Y N. Mathematical models to describe iontophoretic transport *in vitro* and *in vivo* and the effect of current application on the skin barrier [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2013, 65(2): 315-329.
- [4] Chen Y, Alberti I, Kalia Y N. Topical iontophoretic delivery of ionizable, biolabile aciclovir prodrugs: A rational approach to improve cutaneous bioavailability [J]. Eur J Pharm Biopharm, 2016, 99: 103-113.
- [5] Santer V, del Río Sancho S, Lapteva M, et al. Targeted intracorneal delivery-biodistribution of triamcinolone acetonide following topical iontophoresis of cationic amino acid ester prodrugs [J]. Int J Pharm, 2017, 525(1): 43-53.
- [6] 中国药典 [S]. 四部. 2020: 466-472.
- [7] Wesolowska A, Jastrzębska-Więsek M, Cios A, et al. The preclinical discovery and development of paliperidone for the treatment of schizophrenia [J]. Expert Opin Drug Discov, 2020, 15(3): 279-292.
- [8] 刘孟斯, 姜典卓, 岳志华, 等. 国内外透皮贴剂申报上市进展及药学研究探讨 [J]. 沈阳药科大学学报, 2021, 38(8): 866-869.
- [9] Weng W, Quan P, Liu C, et al. Design of a drug-in-adhesive transdermal patch for risperidone: Effect of drug-additive interactions on the crystallization inhibition and *in vitro/in vivo* correlation study [J]. J Pharm Sci, 2016, 105(10): 3153-3161.
- [10] Raval S, Jani P, Patil P, et al. Enhancement of bioavailability through transdermal drug delivery of paliperidone palmitate-loaded nanostructured lipid carriers [J]. Ther Deliv, 2021, 12(8): 583-596.
- [11] Ackaert O W, de Graan J, Capancioni R, et al. The *in vitro* and *in vivo* evaluation of new synthesized prodrugs of 5-OH-DPAT for iontophoretic delivery [J]. J Control Release, 2010, 144(3): 296-305.
- [12] Yu Y Q, Yang X, Wu X F, et al. Enhancing permeation of drug molecules across the skin via delivery in nanocarriers: Novel strategies for effective transdermal and development [J]. Chin J Clin Pharmacol, 2021, 37(10): 1255-1260, 1265.

Liu M S, Han H C, Sun C M. The application of non-oral modified release preparation in the treatment of schizophrenia and general consideration for its research

- applications [J]. Front Bioeng Biotechnol, 2021, 9: 646554.
- [13] Kalaria D R, Patel P, Patravale V, et al. Comparison of the cutaneous iontophoretic delivery of rasagiline and selegiline across porcine and human skin *in vitro* [J]. Int J Pharm, 2012, 438(1/2): 202-208.
- [14] Marro D, Guy R H, Delgado-Charro M B. Characterization of the iontophoretic permselectivity properties of human and pig skin [J]. J Control Release, 2001, 70(1/2): 213-217.
- [15] Cai Y L, Zhou Y, Zhang P Y, et al. Tissue levels of flurbiprofen in the rat plantar heel after short-duration topical iontophoresis are sufficient to induce pharmacodynamic responses to local pain stimuli [J]. Pharmaceutics, 2020, 12(7): E608.

[责任编辑 兰新新]

第四届中国中药资源大会于银川成功召开



2022年8月18—19日第四届中国中药资源大会于宁夏银川隆重召开。本届大会由中国中药协会、中国自然资源学会联合主办,以"中药资源与产业高质量发展——东西部科技合作助力黄河流域中药资源产业高质量发展"为主题,旨在贯彻习近平总书记关于黄河流域生态保护和高质量发展的重要指示要求和视察宁夏重要讲话精神,推动宁夏高水平建设全国东西部科技合作引领区,有效服务于国家乡村振兴和健康中国战略。

本届大会采用线下线上相结合的方式同步召开,来自全国27个省、自治区、直辖市和香港特别行政区的专家、学者、企业代表汇聚一堂。本届大会组委会主席、中国自然资源学会中药及天然药物资源专业委员会主任委员、南京中医药大学江苏省中药资源产业化过程协同创新中心主任段金廛教授主持开幕式,大会学术委员会主席、中国工程院院士、国家中医药管理局副局长、中国中药协会会长黄璐琦,大会学术委员会名誉主席、中国工程院院士、国际著名药用植物与传统药物学家肖培根等15位中医药及农业领域知名专家做大会特邀报告。天津中草药杂志社陈常青总经理兼总编应邀参加并与各位到会专家深入交流,天津中草药杂志社作为一个中医药领域学术交流平台,努力在中药资源与产业高质量发展中作出更大贡献。

(本刊讯)