

· 制剂与质量 ·

大鼠皮肤角质层对青藤碱脂质体贴剂透皮吸收的影响

张英丰, 汪小根, 周莉玲

(广州中医药大学, 广东 广州 510405)

摘要:目的 考察大鼠皮肤角质层对青藤碱脂质体贴剂透皮吸收的影响。方法 采用 Franz 扩散池法分别考察正常腹部、背部皮肤及经采用胶带剥离法制备的去角质层腹部、背部皮肤的透皮吸收特性,以预设的采样间隔采样,HPLC 法检测,以单位面积累积透皮量对时间拟合,透皮速率常数(J)作为判断的标准。结果 除去角质层的腹部及背部皮肤比相应部位的正常皮肤 J 有明显增加,且皮肤中药物释放速率常数也大于相应部位的正常皮肤。结论 皮肤角质层对青藤碱脂质体贴剂透皮特性有显著影响,在制备动物皮肤时应注意皮肤的完整性。

关键词:青藤碱脂质体贴剂;胶带剥离;角质层;透皮吸收

中图分类号:R283.62;R286.02

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2006)09-1322-03

Impact of rat skin stratum corneum on transdermal absorption characteristic of Sinomenine Liposome Patch

ZHANG Ying-feng, WANG Xiao-gen, ZHOU Li-ling

(Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

Abstract: **Objective** To study the effect of skin stratum corneum on transdermal absorption characteristic of Sinomenine Liposome Patch. **Methods** The normal and stripped stratum corneum skin of back and abdomen was used to study the transdermal absorption characteristic by Franz method. The transdermal absorption sample was taken at the preset sampling time point. The sample content was determined by HPLC. The cumulative transdermal amount of per unit area was fitted with sampling time point, the transdermal rate constant (J value) was selected as comparative standard. **Results** The transdermal rate constant (J) of skin with stratum corneum stripped increased obviously than that of the normal skin, so was the released rate constant. **Conclusion** The skin stratum corneum has an notable impact on transdermal absorption characteristic of Sinomenine Liposome Patch. When the skin of experimental animal being prepared, the integrality should be paid more attention.

Key words: Sinomenine Liposome Patch; tape stripping; stratum corneum (SC); transdermal absorption

皮肤角质层是药物透皮扩散的主要屏障已经成为共识,角质层的厚度 0.8~1.2 mm,角质层细胞填充主要是类脂形成的液晶结构,这种致密“砖泥结构”,既作为机体的一种防御屏障,也是药物扩散的主要屏障。本实验采用 Franz 扩散池法从定量研究青藤碱透皮吸收的角度考察角质层对药物透皮吸收、皮肤药物储库的影响,为透皮试验时动物皮肤的制备、体外试验相关影响因素的控制提供借鉴。

1 仪器与试剂

日本岛津 LC-10AT HPLC, SPD-10A 可变波长紫外检测器,N2000 双通道色谱工作站;TK-12A 型透皮扩散试验仪(上海锴凯科技贸易有限公

司,接收室容积 7 mL,有效透皮面积 2.92 cm²;十万分之一电子分析天平(Sartorius 公司);LD5-2A 型高速离心机(北京医用离心机制造厂)。

青藤碱对照品购于中国药品生物制品检定所(批号 0774-200105);色谱纯甲醇,水为超纯水,其他试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 青藤碱的 HPLC 法测定

2.1.1 色谱条件:色谱柱:大连依利特 Hypersil BDS 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为甲醇-水(50:50,加入的 0.2% 乙二胺作为改性剂);体积流量为 1 mL/min;检测波长为 265 nm;柱温为室温。

收稿日期:2005-11-06

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30371783);广州市科技局资助项目(2002Z3-E5011)

作者简介:张英丰(1977—),男,广州中医药大学 2003 级博士研究生,研究方向为生物药剂学与药动学。

E-mail: fredzhangfeng@163.com

2.1.2 标准曲线的制备:精密称取 P_2O_5 干燥至恒重的青藤碱对照品 7.50 mg,置于 25 mL 量瓶中,甲醇定容,振摇即得 0.30 mg/mL 对照品贮备液。分别吸取 0.5、2、4、6、8、10、12、14 μ L 注入高效液相色谱仪。以峰面积对进样量进行线性回归,得回归方程 $Y=467\ 978\ X+17\ 633$, $r=0.999\ 7$,进样量在 0.15~4.2 μ g 与峰面积呈良好的线性关系。再取 1 mL 置于 25 mL 量瓶中,甲醇定容,分别吸取 0.5、1、2、4、6、8、10、12 μ L 注入高效液相色谱仪,以峰面积对进样量进行线性回归,得回归方程 $Y=480\ 622\ X+492.37$ ($r=0.999\ 1$),进样量在 0.006~0.144 4 μ g 与峰面积呈良好的线性关系。

2.1.3 精密度试验:高、低质量浓度对照品液在 1 d 内连续进样 5 次,每次进样 10 μ L,并分别在连续 5 d 每天进样 1 次,每次进样 10 μ L,考察日内 RSD 和日间 RSD,结果分别为 0.53%、1.08%、2.08%、2.98%。

2.1.4 稳定性试验:取供试品溶液分别于 0、2、4、8、24 h 进样测定,结果青藤碱峰面积的 RSD 为 2.52%,表明供试品溶液在 24 h 内比较稳定。

2.1.5 阴性干扰试验:按透皮试验方法将空白脂质体贴剂贴于皮肤表面,接收室加入 7 mL pH 6.8 的 PBS 液(实测 pH 6.73),在 24 h 时用微量进样器取出 100 μ L 接收液进样分析,结果表明在青藤碱出峰位置无干扰峰,分析条件可行。

取空白大鼠皮肤按 2.6 项下的皮肤处理方法处理,进样 10 μ L,结果表明皮肤内源性成分对青藤碱无明显干扰,皮肤处理条件可行。

2.2 离体皮肤及去角质层皮肤的制备:取雌性体重 180~200 g SD 大鼠,用 BaS 在腹部及背部脱毛,并饲养 1 周以待 BaS 对皮肤造成的损伤完全恢复。脱颈处死后分别取下腹部及背部皮肤,仔细剥离皮下脂肪组织,并用生理盐水反复冲洗,直至无浑浊为止,将制备好的一半皮肤用压敏胶带均匀用力地、平行操作地剥离角质层各 25 次,得去角质层背部及腹部皮肤^[1]。

2.3 接收液的处理:接收液为 7 mL 经过 10 min 超声脱气并放冷至室温的 pH 6.8 的 PBS 液(实测 pH 6.73)。

2.4 皮肤的预处理:皮肤自然解冻后固定于 Franz 扩散池,角质层向上,在达到预定温度后平衡 1 h。

2.5 透皮吸收试验:考察温度设定 32 $^{\circ}$ C。采用 TK-12A 型透皮扩散试验仪,将上述 4 种皮肤同时

固定在 Franz 扩散池内^[2],皮肤上表面与剥离保护层的青藤碱脂质体贴剂紧密接触,真皮层与接收液接触。在接收室中注入接收液 7 mL 并小心将气泡完全驱逐出。磁力搅拌转速为 (200 ± 10) r/min,分别在 0.5、1、2、4、6、8、10、12、14、22、24 h 用注射器吸取 1 mL 接收液,并随即补充相同体积、相同温度、相同组成的接收液。样品经 0.44 μ m 水系微孔滤膜滤过后按上述色谱条件进样 10 μ L,测定青藤碱的质量浓度。实验重复 3 次。

2.6 皮肤储库效应的考察:在经皮渗透结束后立即剥离脂质体贴剂,取出全部接收液换以新鲜的 7 mL 接收液,用恒温 32 $^{\circ}$ C 的生理盐水液冲洗皮肤表面后,将皮肤继续固定在 Franz 扩散池内,并在 2、4、6、8、10、24 h 取样 2 mL 置于 10 mL 具塞玻璃离心管内,加入 5 mL 碱性氯仿,涡旋混匀器混匀 1 min 后 3 000 r/min 离心 5 min,用干燥的刻度吸管精密吸取 4 mL 萃取液,50 $^{\circ}$ C N_2 吹干,100 μ L 甲醇涡旋 1 min 溶解残渣后转移到 0.5 mL 的 EP 管中,10 000 r/min 离心 5 min 后进样 10 μ L 分析。在皮肤释放结束后立即将皮肤剪碎置玻璃匀浆器内,碱性氯仿(1 mL $\times$ 3)匀浆,3 000 r/min 离心 5 min 后将氯仿 50 $^{\circ}$ C N_2 吹干,100 μ L 甲醇涡旋 1 min 溶解残渣后转移到 0.5 mL 的 EP 管中,10 000 r/min 离心 5 min 后进样 10 μ L 分析。实验重复 3 次。

2.7 结果处理:采用 SPSS11.0 数据处理软件处理数据。按以下公式计算单位面积累积渗透量。

$$Q = \frac{C_n \times 7 + \sum_{i=1}^{n-1} C_i \times 1}{A} \quad Q_{(T)} = \frac{C_n \times 7 + \sum_{i=1}^{n-1} C_i \times 2}{A} + Q_{\text{匀浆}}$$

式中, Q :单位面积累积渗透量(μ g/ cm^2); C_n :第 n 个取样点测得的药物质量浓度(μ g/mL); C_i :第 i ($i=n-1$) 个取样点测得的药物质量浓度(μ g/mL); A :有效透皮面积($2.92\ cm^2$)

以 Q 的平均值对时间 t 分别按零级、Higuchi 方程^[3]进行拟合,所得方程的斜率即为透皮速率常数(J),同时以 $EF = J_{\text{去角质层皮肤}}/J_{\text{正常皮肤}}$ 评价角质层对药物经皮渗透的影响。结果见表 1。

以单位面积累积释放量 $Q_{(T)}$ 的平均值对时间 t 分别按零级、Higuchi 方程进行拟合,所得方程的斜率即为皮肤储库释放速率常数(R), $R' = R_{\text{去角质层皮肤}}/R_{\text{正常皮肤}}$ 评价剥离角质层对药物经皮释放的影响。累积释放量与皮肤残留药量之和即为皮肤储库总药量。结果见表 2。

皮肤储库的总药量计算为: $Q_{(T)} = Q_{\text{释放}} + Q_{\text{匀浆}}$,结果见表 3。

表 1 脂质体贴剂透皮吸收特性拟合方程 (n=3)

Table 1 Fitting equations on transdermal absorption characteristic of Sinomenine Liposome Patch (n=3)

皮 肤	回归方程		J	EF
腹部皮肤	$Q=9.7188t+0.9948$	($r^2=0.9870$)	9.7188	
	$Q=55.5t^{1/2}-59.7397$	($r^2=0.9625$)	55.5000	
去角质层腹部皮肤	$Q=34.6815t+142.8048$	($r^2=0.9533$)	34.6815	3.5685
背部皮肤	$Q=205.4623t^{1/2}-92.6096$	($r^2=0.9849$)	205.4623	3.7020
	$Q=3.6719t+3.5407$	($r^2=0.9964$)	3.6719	
去角质层背部皮肤	$Q=19.6284t^{1/2}-23.6900$	($r^2=0.9137$)	19.6284	
	$Q=15.3812t-2.1595$	($r^2=0.9972$)	15.3812	4.1889
	$Q=83.4282t^{1/2}-90.0411$	($r^2=0.9137$)	83.4282	4.2504

当以零级拟合时, J 的单位是 $\mu\text{g}/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})$; 当以 Higuchi 拟合时, J 的单位是 $\mu\text{g}/(\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{1/2})$, 表 2 同
When fitting in zero order unit of J is $\mu\text{g}/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})$; When fitting in Higuchi unit of J is $\mu\text{g}/(\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{1/2})$, Table 2 is same

表 2 脂质体贴剂皮肤释放特性拟合方程 (n=3)

Table 2 Fitting equations on skin releasing characteristics of Sinomenine Liposome Patch (n=3)

皮 肤	回归方程		R	R'
腹部皮肤	$Q=0.4722t+0.6413$	($r^2=0.9928$)	0.4722	
	$Q=3.0455t^{1/2}-3.6130$	($r^2=0.9621$)	3.0455	
去角质层腹部皮肤	$Q=0.8299t+0.0262$	($r^2=0.9760$)	0.8299	1.7575
背部皮肤	$Q=5.1479t^{1/2}-7.0747$	($r^2=0.9857$)	5.1479	1.6884
	$Q=0.5593t+3.1551$	($r^2=0.9105$)	0.5593	
去角质层背部皮肤	$Q=3.75t^{1/2}-1.9952$	($r^2=0.9313$)	3.7500	
	$Q=1.2645t+2.9989$	($r^2=0.8981$)	1.2645	2.2609
	$Q=8.2010t^{1/2}-8.6568$	($r^2=0.9511$)	8.2010	2.1869

表 3 脂质体贴剂皮肤储库效应

Table 3 Skin storing effect of Sinomenine Liposome Patch

皮肤	$Q_{\text{释放}}$	$Q_{\text{匀浆}}$	$Q_{(T)}$
腹部皮肤	34.76	3.17	37.93
去角质层腹部皮肤	48.76	2.57	51.33
背部皮肤	42.20	1.90	44.10
去角质层背部皮肤	83.30	2.65	85.95

可以看出, 皮肤储库总的药量顺序为:

$Q_{\text{去角质层背部}} > Q_{\text{去角质层腹部}} > Q_{\text{背部}} > Q_{\text{腹部}}$ 。

从不同拟合方程所得到的 EF 值来看, 除去角质层的皮肤的透皮速率常数要明显高于正常皮肤, 且同一皮肤不同方程拟合得到的比值接近, 腹部皮肤与背部皮肤之间的 EF 值差异不大, 表明角质层对腹部及背部皮肤有相同或相近的影响。

从皮肤释放特性来看, 根据 R' 值, 表明去角质层的皮肤释放速率常数要快于正常皮肤。皮肤储库储存的总药量: $Q_{\text{去角质层背部}} > Q_{\text{去角质层腹部}} > Q_{\text{背部}} > Q_{\text{腹部}}$ 。

3 讨论

在药物渗透时根据扩散室与接收室的浓度差扩散, $J=DK\Delta C/h^{[4]}$ (D 为扩散系数, K 为分配系数, ΔC 为扩散室与接收室的浓度差, h 为角质层厚度), 由上式看出 J 与浓度差成正比。当药物扩散结束后, 残留在皮肤中的药物储库做为扩散的原动力, 替代了原 ΔC 起的作用。药物在储库的推动下被动

扩散进接收室内。因除去了角质层, 故药物相比于完整皮肤渗透明显增多, 而皮肤储库释放速率亦明显快过完整皮肤。

从药物透皮吸收行为看, 根据 $J=DK\Delta C/h$ 可知 J 与皮肤厚度 h 成反比, 因大鼠背部皮肤比腹部皮肤厚, J 相比于腹部皮肤小, 去角质层的背部皮肤 J 也小于去角质层腹部皮肤 J 。

从皮肤释放药物行为看, 去角质层皮肤因除去角质层这个主要渗透屏障, 吸收速率快于完整皮肤, 沉积于皮肤内部的量 (即形成药物储库) 相应也大于完整皮肤, 故在以药物储库做为扩散原动力的情况下去角质层皮肤的释放速率快于完整皮肤。因背部皮肤厚于腹部, 相应皮肤中沉积的药物量也高于腹部, 故从结果可以看到背部皮肤的释放快于腹部皮肤, 去角质层背部皮肤释放快于去角质层腹部皮肤。

References:

[1] Jakasa I, Calkoen F, Kezic S. Determination of polyethylene glycols of different molecular weight in the stratum corneum [J]. *J Chromatogr B*, 2004, 811 (2): 177-182.
[2] Fernanda S D R, Renata F V L. *In vitro* skin permeation and retention of 5-aminolevulinic acid ester derivatives for photodynamic therapy [J]. *J Controlled Release*, 2003, 89 (2): 261-269.
[3] Dara F, John C. Release characteristics of anionic drug compounds from liquid crystalline gels I: Passive release across non-rate-limiting membranes [J]. *Int J Pharm*, 2005, 301 (1,2): 226-236.
[4] Tirnaksiz F, Yuce Z. Development of transdermal system containing nicotine by using sustained release dosage design [J]. *Farmaco*, 2005, 60 (9): 763-770.