

利用 ATR-FTIR 变化探讨薄荷醇对皮肤角质层结构的影响

薛漫清, 梁 庆, 黄 钊, 聂 昊, 刘文彬, 王 晖*

广东药学院, 广东 广州 510006

摘 要:目的 探讨薄荷醇对皮肤角质层结构影响的作用机制。方法 大鼠皮肤角质层样本和健康志愿者皮肤给予薄荷醇后, 测定全衰减反射傅里叶变换红外光谱 (ATR-FTIR) 在皮肤角质层的变化, 以确定皮肤角质层结构是否改变。结果 在大鼠皮肤实验中, 与对照组和溶剂组相比, 氮酮组大鼠角质层中的 CH_2 对称振动 ($2\,854\text{ cm}^{-1}$) 发生了相对位移, 角蛋白 NH-C=O 振动 I 峰 ($1\,659\text{ cm}^{-1}$) 及 II 峰 ($1\,637\text{ cm}^{-1}$) 发生了位移, NH-C=O 振动 I 峰发生了裂峰; 薄荷醇组大鼠角质层中 CH_2 非对称振动 ($2\,925\text{ cm}^{-1}$)、 CH_2 对称振动 ($2\,854\text{ cm}^{-1}$) 发生相对位移。在人体皮肤试验中, 与对照区和溶剂区相比, 氮酮组 CH_2 非对称振动 ($2\,921.5\text{ cm}^{-1}$) 和 CH_2 对称振动 ($2\,852.1\text{ cm}^{-1}$) 发生了 3~4 个波长位移; 薄荷醇组 CH_2 非对称振动 ($2\,922.7\text{ cm}^{-1}$) 和 CH_2 对称振动 ($2\,853.8\text{ cm}^{-1}$) 发生了 3~4 个波长位移。结论 薄荷醇可能是通过改变角质层中脂质的构象, 使角质层脂质双分子层的流动性增加、有序致密结构改变, 降低皮肤屏障作用, 从而使药物的透过性增加。

关键词: 薄荷醇; 透皮吸收; 角质层结构; 全衰减反射傅里叶变换红外光谱; 脂质

中图分类号: R943 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)12-2474-04

Effect of *l*-menthol on skin keratoderma structure by ATR-FTIR changes

XUE Man-qing, LIANG Qing, HUANG Zhao, NIE Hao, LIU Wen-bin, WANG Hui

Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China

Key words: *l*-menthol; transdermal absorption; keratoderma structure; attenuated total reflection-FTIR (ATR-FTIR); lipid

薄荷醇作为一种药物透皮吸收促渗剂, 效果已被证实^[1-2], 但其促进药物透皮吸收作用机制的研究鲜见报道。本实验采用全衰减反射傅里叶变换红外光谱 (attenuated total reflection-FTIR, ATR-FTIR) 技术, 通过观察大鼠皮肤样本和健康受试者皮肤给予薄荷醇后, 角质层 ATR-FTIR 光谱的变化, 确定角质层结构是否发生改变, 以探究薄荷醇的促透皮吸收的作用机制。

1 材料

1.1 药品与试剂

l-薄荷醇, 质量分数 99%, 上海香料厂; 氮酮 (水溶性), 新乡高金药业有限公司, 批号 20060710; 硫化钠、AR, 天津市福晨化学试剂厂; 其他试剂均为分析纯。

1.2 动物

SD 大鼠, 雄性, SPF 级, 体质量 180~200 g, 由广州中医药大学实验动物中心提供, 合格证号

SCXK (粤) 20080020。

1.3 主要仪器

Equinox55 ATR-FTIR 光谱仪, 德国 Bruker 公司。

2 方法

2.1 ATR-FTIR 条件

室温 18~20 °C, 相对湿度 64%, 反射棱镜 (ZnSe), 入射角 45°, 扫描次数 256 次, 分辨率 2 cm^{-1} 。

2.2 大鼠皮肤角质层实验

2.2.1 样本采集与处理^[3-4] 大鼠以硫贲妥钠麻醉, 固定, 剔净背部脊椎左右两侧约 4 cm^2 的皮肤, 仔细剥离并剪取规定大小的皮肤, 除去皮下脂肪层等残留物, 用生理盐水反复冲洗。皮肤浸在 60 °C 蒸馏水中 30 min 后, 放入 10 g/L 胰蛋白酶溶液中, 于 37 °C 恒温水浴 4 h, 取出皮肤放入另外 10 g/L 胰蛋白酶溶液中, 在室温条件下放置 12 h。取出皮肤后除去真皮层等残留物, 仔细分离出表皮, 用蒸馏水反复冲洗干净, 再用滤纸吸干水分, 即为角质层, 备用。

收稿日期: 2012-02-13

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81072591)

作者简介: 薛漫清, 女, 副主任护师, 主要从事皮肤药理学研究。E-mail: xuemq08@sina.com

*通讯作者 王 晖 E-mail: gdwanghui2006@126.com

2.2.2 分组与给药 将制备好的角质层放入 4 个有盖小瓶中, 分别作为对照组(空瓶)、乙醇-生理盐水(3:2)溶剂组、2%薄荷醇组^[5]、2%氮酮组^[6], 其中 2%薄荷醇和 2%氮酮均用乙醇-生理盐水(3:2)配制。向小瓶中加入相应测试物溶液 10 mL, 在 37 ℃处理 24 h 后, 用蒸馏水将角质层表面的测试物冲洗干净, 滤纸吸干, 真空干燥。用 ATR-FTIR 对干燥后的角质层进行扫描。

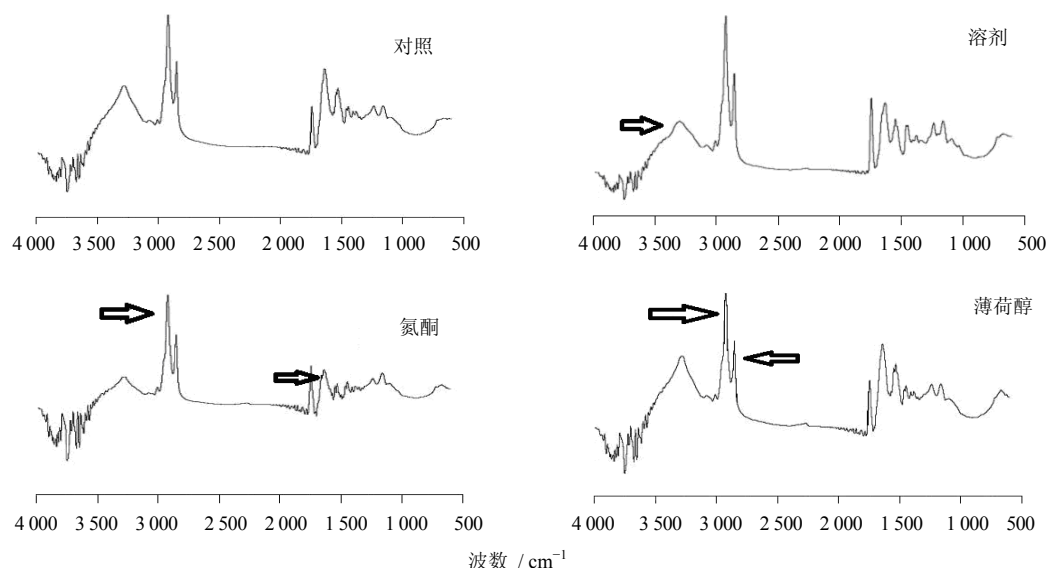
2.3 人体试验^[4,7]

健康志愿者, 26 岁, 男性, 无皮肤病史。在实验前 48 h 内手臂皮肤测试部位未用过任何化妆品及外用药物。试验前, 用药部位用蒸馏水冲洗干净, 轻轻擦干, 酒精棉球擦拭并自然晾干。两手的前臂共划分为 4 个区域(每个区域大小约 3 cm×3 cm), 分别作为对照区、乙醇-生理盐水(3:2)溶剂处理区、2%氮酮溶液处理区、2%薄荷醇溶液处理区。在 4 个区域分别放置直径为 3 cm 的圆形滤纸, 分别滴加相应测试物溶液, 使滤纸完全润湿, 滤纸上放一层蜡纸, 再用无菌敷贴膜密封。8 h 后用药棉将被处理部位彻底擦拭干净, 再用酒精棉球轻擦 2 遍, 让皮肤在室温下自然恢复 1 h 后进行 ATR-FTIR 测定。

3 结果

3.1 对大鼠皮肤角质层的影响

对照组大鼠皮肤角质层中的脂质吸收峰 OH 振动为 3 276 cm⁻¹, C=O 振动为 1 744 cm⁻¹, CH₂ 非对称振动为 2 922 cm⁻¹, CH₂ 对称振动为 2 851 cm⁻¹, 角蛋白 NH-C=O 振动 I 峰为 1 642 cm⁻¹, NH-C=O 振动 II 峰为 1 547 cm⁻¹。溶剂组皮肤角质层中的脂质吸收峰 OH 振动为 3 301 cm⁻¹, 与对照组相比该峰位向高峰位移动, 表明可能发生水合作用, 其余吸收峰与对照组相比均未发生明显位移。氮酮组皮肤角质层中的脂质 CH₂ 对称振动(2 854 cm⁻¹), 与对照组及溶剂组相比发生了相对位移, 表明脂质的构象发生改变; 而角蛋白 NH-C=O 振动 I 峰(1 659 cm⁻¹)及 NH-C=O 振动 II 峰(1 637 cm⁻¹)与对照组和溶剂组相比发生了位移, 且 NH-C=O 振动 I 峰发生了裂峰, 表明角蛋白的构象也发生了改变。薄荷醇组皮肤角质层中的脂质的 CH₂ 非对称振动为 2 925 cm⁻¹, CH₂ 对称振动为 2 854 cm⁻¹, 与对照组及溶剂组相比发生了相对位移; 而角蛋白 NH-C=O 振动 I 峰及 NH-C=O 振动 II 峰未发生位移, 表明薄荷醇可能对脂质的结构或构象产生了作用而对角蛋白并无影响。结果见图 1。



箭头所指: 溶剂组脂质吸收峰 OH 振动向高峰位移动; 氮酮组 CH₂ 对称振动向高峰位移动, 角蛋白 NH-C=O 振动 I 峰发生了裂峰; 薄荷醇组 CH₂ 非对称振动和 CH₂ 对称振动向高峰位移动

In solvent group, OH vibration as lipid absorption wavelength has a blue shift; In azonone group, CH₂ nonsymmetrical vibration wavelength has a blue shift, keratin NH-C=O vibration I wavelength has a split peak; In *l*-menthol group, both CH₂ nonsymmetrical vibration wavelength and symmetrical vibration wavelength have a blue shift

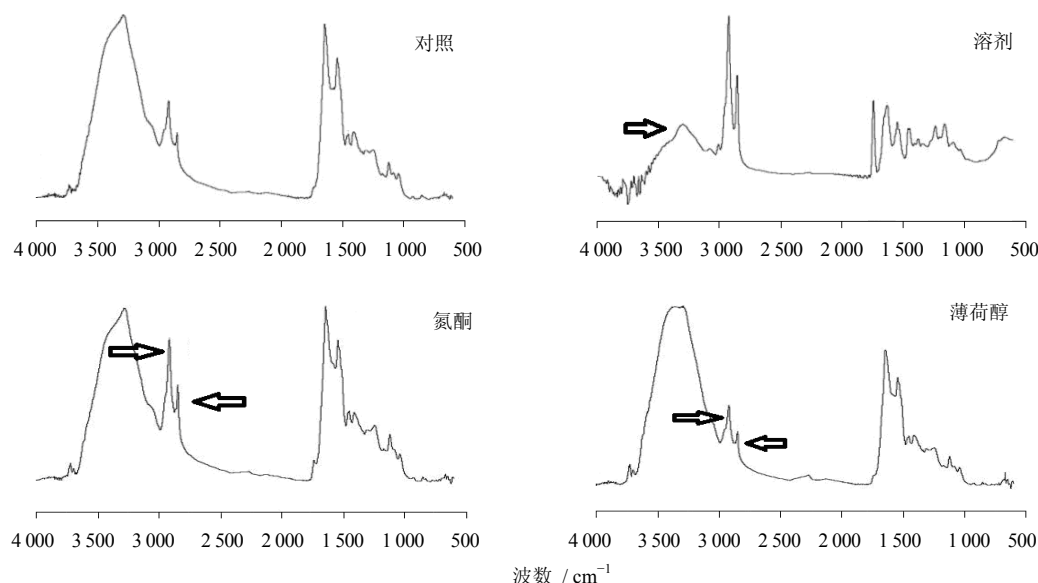
图 1 薄荷醇对大鼠皮肤角质层 ATR-FTIR 图谱的影响

Fig. 1 Effects of *l*-menthol on ATR-FTIR spectra of skin keratoderma structure in rats

3.2 对人皮肤角质层的影响

人手臂正常表皮中脂质的吸收峰 OH 振动为 $3\,293.6\text{ cm}^{-1}$, CH_2 非对称振动为 $2\,918.7\text{ cm}^{-1}$, CH_2 对称振动为 $2\,850.5\text{ cm}^{-1}$, NH-C=O 振动 I 峰为 $1\,647.8\text{ cm}^{-1}$, NH-C=O 振动 II 峰为 $1\,544.6\text{ cm}^{-1}$ 。溶剂组各吸收峰与对照组相比,均未发生明显的位移。与对照组及溶剂组相比,氮酮组 CH_2 非对称振动为 $2\,921.5\text{ cm}^{-1}$, CH_2 对称振动为 $2\,852.1\text{ cm}^{-1}$, 发生了 3~4 个

波长位移,表明氮酮可能对人表皮中脂质的结构或构象产生影响。与对照组及溶剂组相比,薄荷醇组皮肤角质层脂肪的 CH_2 非对称振动为 $2\,922.7\text{ cm}^{-1}$, CH_2 对称振动为 $2\,853.8\text{ cm}^{-1}$, 发生了 3~4 个波长位移; NH-C=O 振动 I 峰及 NH-C=O 振动 II 峰未发生明显位移,表明薄荷醇只对人表皮中脂质的结构或构象产生影响,而对角蛋白并未产生影响。结果见图 2。



箭头所指: 氮酮组 CH_2 非对称振动和 CH_2 对称振动向高峰位移动; 薄荷醇组 CH_2 非对称振动和 CH_2 对称振动向高峰位移动

In azone group, CH_2 nonsymmetrical vibration wavelength and symmetrical vibration wavelength both have a blue shift; In *l*-menthol group, both CH_2 nonsymmetrical vibration wavelength and symmetrical vibration wavelength have a blue shift

图 2 薄荷醇对人皮肤角质层 ATR-FTIR 图谱的影响

Fig. 2 Effects of *l*-menthol on ATR-FTIR spectra of skin keratoderma structure in human

4 讨论

皮肤中角质层的主要生化成分为蛋白质、脂类和水,其蛋白质主要是角蛋白,脂类主要是三酰甘油、游离脂肪酸、胆固醇和磷脂等。角质层结构的完整性、状态及功能,在维持其通透性及屏障作用方面起着至关重要的作用。脂质成分及角蛋白的结构、状态及构象等发生改变,角质层的结构及构象也会随之发生变化,其通透性及屏障作用也将改变。测定脂类及蛋白质的结构及构象的常用方法是红外光谱技术,通过测定脂类及蛋白质主要特征峰来判断其结构及构象的变化^[8]。ATR-FTIR 是一种很有效的红外光谱实验方法,它不需要通过透过样品的信号,而是通过样品表面的反射信号获得样品表层有机成分的结构信息,该技术在研究样品表面性质方面显示出独特的应用价值。ATR-FTIR 技术无需制

样,不具破坏性,为在体研究人体皮肤的屏障功能和促渗透剂的作用机制以及药物的经皮吸收提供了具有实用价值的手段^[4-9]。

角质层在 $2\,800\sim2\,950\text{ cm}^{-1}$ 的 CH_2 伸缩振动峰的位移是表示脂质侧链 CH_2 自由度水平的灵敏指标,波数位移的大小与 CH_2 的偏转/全反构象体的比例有关^[10]。有研究表明,人、猪、大鼠的角质层中均有一个随温度升高的相转变过程, CH_2 对称伸缩振动峰和 CH_2 不对称伸缩振动峰位移幅度在 $6\sim3\text{ cm}^{-1}$ ^[11]。本实验中发现,与对照组及溶剂组比较,经薄荷醇与氮酮处理过的人及大鼠皮肤角质层中脂质的 CH_2 伸缩振动峰峰位向高峰位移动了 3~4 个波长,表明脂质侧链 CH_2 构象发生了改变,角质层中脂质排列的无序性增加,与相关报道相符^[12-13]。本实验结果还表明,氮酮对大鼠皮肤角质层角蛋白

产生影响,但对人表皮角蛋白却未产生影响,可能是人与大鼠的表皮结构有差异。

综上所述,薄荷醇在大鼠实验和人体试验中均使角质层脂质的 CH_2 伸缩振动峰发生了位移,表明薄荷醇与氮酮可能是通过改变角质层中脂质的构象,使得角质层脂质双分子层的流动性增加,有序致密结构改变,进而导致角质层脂质的无序性增加,使皮肤的通透性增加,屏障作用降低。

参考文献

- [1] 王 晖, 许卫铭, 冯小龙. 薄荷醇对两种不同性质化合物体外经兔皮吸收的影响 [J]. 中国药房, 2002, 13(3): 141-142.
- [2] Liu H Z, Li S M, Wang Y J, *et al.* Effect of vehicles and enhancers on the topical delivery of cyclosporin A [J]. *Int J Pharm*, 2006, 311(1/2): 182-186.
- [3] 张志慧, 周雪琴, 许 晶, 等. 化学促透剂与鼠角质层脂质相互作用的 ATR-FTIR [J]. 化学研究与应用, 2005, 17(1): 64-65.
- [4] 姜 恒, 张晓彤, 刘立军, 等. 衰减全反射-傅里叶变换红外光谱法在中药贴膏剂和皮肤病研究中的应用 [J]. 分析仪器, 2003(2): 26-28.
- [5] 刘文彬, 王 晖, 黄 钊. 熵权系数法综合评价促透剂的促透效果 [J]. 华西药学, 2011, 26(3): 256-258.
- [6] 梁 庆. 薄荷醇的促透机制及其机制研究 [D]. 广州: 广东药学院, 2009.
- [7] Wartewig S, Neubert R H. Properties of ceramides and their impact on the stratum corneum structure: A review. Part 1: ceramides [J]. *Skin Pharmacol Physiol*, 2007, 20(5): 220-229.
- [8] Corbe E, Laugel C, Yagoubi N, *et al.* Role of ceramide structure and its microenvironment on the conformational order of model stratum corneum lipids mixtures: An approach by FTIR spectroscopy [J]. *Chem Phys Lipids*, 2007, 146(2): 67-75.
- [9] Corbe E, Laugel C, Yagoubi N, *et al.* Role of ceramide structure and its microenvironment on the conformational order of model stratum corneum lipids mixtures: An approach by FTIR spectroscopy [J]. *Chem Phys Lipids*, 2007, 146(2): 67-75.
- [10] 丁平田, 郝劲松, 郑俊民. 应用 ATR-FTIR 研究二种皮肤渗透促透剂的作用机理 [J]. 生物物理学报, 2000, 16(1): 48-52.
- [11] Naik A, Pechtold L R A M, Potts R O, *et al.* Mechanism of oleic acid induced skin penetration enhancement *in vivo* in humans [J]. *J Controlled Release*, 1995, 37(2): 299-306.
- [12] Narishetty S T, Panchagnula R. Effect of *l*-menthol and 1, 8-cineole on phase behavior and molecular organization of SC lipids and skin permeation of zidovudine [J]. *J Controlled Release*, 2005, 102(1): 59-70.
- [13] Zhou X Q, Xu J, Yao K D, *et al.* Interaction of 1-dodecylazacycloheptan-2-one with mouse stratum corneum [J]. *J Biomater Sci Polym Ed*, 2005, 16(5): 563-574.