

Chinese Journal of New Drugs 2012 21(8)

• 实验研究 •

透皮促进剂对白花前胡甲素体外经皮渗透的影响

张贤华^{1,2}, 串星星², 洪晓翔¹, 金梅花³, 朱 铨², 洪 颖², 孟飞宏²

(1 厦门大学附属中山医院演武分院药剂科, 厦门 361005; 2 厦门大学药学院, 厦门 361005;

3 延边大学医学部基础医学院生物化学与分子生物学教研室, 延吉 133002)

[摘要] 目的: 考察透皮促进剂对白花前胡甲素 (*dl*-praeurptorin A, Pd-Ia) 体外经皮渗透的影响。方法: 采用改进的 Franz 扩散池, 以大鼠离体皮肤为渗透屏障, 用高效液相色谱法对 Pd-Ia 进行含量测定, 考察月桂氮 酮 (Azone) 及 1% Azone 与不同浓度丙二醇 (PG) 混合物对 Pd-Ia 透皮吸收的影响。结果: 使用 Azone 对 Pd-Ia 有促透作用, 1% Azone 效果较好, 平均渗透速率达到 $4.064 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$; 1% Azone 与 15% PG 合用促透效果最好, 平均渗透速率达到 $4.889 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$, 且与单用 1% Azone 有显著性差异 ($P < 0.05$)。结论: 1% Azone 与 15% PG 合用时, 含 0.5% Pd-Ia 溶液体外渗透具有最大促透效果, 体现出协同作用。

[关键词] 白花前胡甲素; 经皮渗透; 促进剂; 月桂氮 酮; 丙二醇

[中图分类号] R94 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1003-3734(2012)08-0926-05

Influence of penetration enhancers on *in vitro* transdermal permeation of *dl*-praeurptorin A

ZHANG Xian-hua^{1,2}, CHUAN Xing-xing², HONG Xiao-xiang¹, JIN Mei-hua³,
ZHU Xuan², HONG Ying², MENG Fei-hong²

(1 Department of Pharmacy, Yanwu Branch Zhongshan Hospital, Xiamen University, Xiamen 361005, China;

2 School of Pharmaceutical Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China;

3 College of Basic Medical Science, Health Science Center, Yanbian University, Yanji 133002, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of penetration enhancers on the *in vitro* transdermal permeation of *dl*-praeurptorin A (Pd-Ia) through rat skin. **Methods:** The permeation experiments were evaluated by Franz diffusion cell in excised rat skin. HPLC-UV method was established to determine the concentration of Pd-Ia in receptor compartment. Azone or 1% Azone combined with propylene glycol (PG) as chemical penetration enhancers were applied to study the skin permeation rates of Pd-Ia. **Results:** 1% Azone alone achieved the highest penetration rate, $4.064 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$. 1% Azone combined with 15% PG was the best penetration enhancer with the maximal penetration rate of $4.889 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$. **Conclusion:** Combination of 1% Azone with 15% PG is effective on transdermal permeation of Pd-Ia *in vitro*, and the combination exerts a synergistic effect.

[Key words] *dl*-praeurptorin A (Pd-Ia); transdermal; penetration enhancers; Azone; propylene glycol (PG)

[基金项目] 厦门市科技计划项目(3502Z20103009); 厦门市科技计划项目(3502Z20093012)

[作者简介] 张贤华, 男, 硕士研究生, 主管药师, 研究方向为药物新剂型研发与药代动力学。联系电话: (0592) 2189597, E-mail: zhan-xianhua2008@163.com.

[通讯作者] 金梅花, 女, 讲师, 研究方向为生物化学。联系电话: (0433) 2435151, E-mail: kimmeihua@ybu.edu.cn.

中药前胡为伞形科植物白花前胡 (*Peucedanum praeruptrum* Dunn) 的干燥根, 具有散风清热、降气化痰的功效, 作为止咳化痰平喘药而广泛应用^[1]。白花前胡甲素 (*dl*-praeurptorin A, Pd-Ia) 为白花前胡根中提取出的一种角型吡喃香豆素^[2], 是一种脂溶性物质。近年来, 药理研究表明, Pd-Ia 作为一种钙

阻滞剂和钾通道开放剂,具有保护心肌缺血^[3-4]和局灶性脑缺血急性损伤作用^[5]。常天辉等^[6-7]在大鼠心肌急性缺血再灌注(MIR)同时静脉注射 Pd-Ia,能抑制血清白细胞介素 6(IL-6)水平,降低心肌凋亡刺激蛋白 Fas、提高 Bcl-2/Bax 的比率,强度与硝苯地平接近。但是,在我们前期实验中发现,Pd-Ia 在大鼠体内的半衰期短;大剂量 Pd-Ia 口服给药后,在血液中也很难检测到,可能与其吸收或在胃肠道被某些消化酶代谢有关,也有可能吸收后很快被肝药酶代谢,首过效应强^[8]。

经皮给药是目前药物制剂研发热点之一,是一种无创伤性给药的新途径,可以避免肝脏首过效应及胃肠道的降解,提高生物利用度;给药后血药浓度可控、持久、恒定,提高疗效,减少毒副作用^[9]。但由于皮肤的屏障作用,使药物经皮渗透速率难以满足临床治疗的需要。因此,经皮给药通常加入适当的透皮促进剂来增加药物的经皮渗透。本实验考察了透皮促进剂月桂氮酮单用或合用丙二醇对 Pd-Ia 体外经皮渗透的促进作用,为 Pd-Ia 经皮给药制剂研究和开发提供参考。

材 料

1 药物与试剂

白花前胡甲素(Pd-Ia,纯度>98%,日本明治药科大学赠送);油酸(批号:0904062,汕头市西陇化工有限公司);月桂氮酮(批号:19186,上海晶纯试剂有限公司);丙二醇(批号:0906111,汕头市西陇化工有限公司);聚乙二醇 400(PEG400,批号:20090310,广东光华化学厂有限公司);甲醇为色谱纯;水为超纯水;其他试剂均为分析纯。

2 仪器

1100 series 高效液相色谱仪(配有 G1311A 型四元输液泵、G1313A 型自动进样器、G1315A 型柱温箱和 G1322A 型脱气装置,美国 Agilent 公司);药物透皮扩散仪及垂直式 Franz 扩散池(接受池体积为 6.5 mL,透过面积为 2.8 cm²,上海黄海药检仪器有限公司);离心机(美国 Sigma 公司);DELTA 320 PH 计(梅特勒-托利多仪器上海有限公司)。

3 动物

SD 大鼠,雄性,体重为 200~250 g,由厦门大学实验动物中心提供,使用许可证:SYXK(闽)2008-0003。

方 法

1 溶解度的测定

取过量 Pd-Ia 置于平底西林瓶中,分别加入 2 mL 纯化水、油酸(OA)、33%乙醇、33%乙醇/油酸,37℃水浴搅拌(300 r·min⁻¹)48 h 达到平衡。样品 6 000 r·min⁻¹离心 10 min,取上清液用甲醇稀释,0.45 μm 微孔滤膜过滤,续滤液用 HPLC 分析,测定 3 次,取平均值,计算溶解度。

2 体外经皮渗透试验

2.1 接受液的选择 取过量 Pd-Ia 置于平底西林瓶中,分别加入 2 mL 生理盐水、10%乙醇生理盐水(乙醇:生理盐水=1:9 v/v)、20%的乙醇生理盐水、30%乙醇生理盐水、33%乙醇生理盐水、10%PEG400 生理盐水、20%PEG400 生理盐水、30%PEG400 生理盐水、35%PEG400 生理盐水,37℃水浴搅拌(210 r·min⁻¹)48 h 达到平衡。取上清液适量 6 000 r·min⁻¹离心 10 min,取上清液用甲醇稀释,0.45 μm 微孔滤膜过滤,续滤液用 HPLC 分析,测定 3 次,取平均值,得到 Pd-Ia 在各种介质中的溶解度。

2.2 供给液的制备 供给液由一定浓度的透皮促进剂 33%乙醇/油酸(v/v)组成,空白对照组不含透皮促进剂,每组溶液都含有 0.5% Pd-Ia。8 组供给液分别为: A: 不含透皮促进剂(作空白); B₁: 1% Azone; B₂: 3% Azone; B₃: 5% Azone; B₄: 7% Azone; C₁: 1% Azone + 5% PG; C₂: 1% Azone + 10% PG; C₃: 1% Azone + 15% PG。

2.3 离体大鼠皮肤的制备 取体重 200~250 g 的雄性 SD 大鼠,乙醚麻醉后,用电动剃须刀剃净腹部体毛,取无损伤皮肤,仔细剔除皮下脂肪和粘连物,用生理盐水冲洗皮肤内外表面,-20℃保存,1 周内使用,使用前自然解冻。

2.4 体外透皮试验 将皮肤固定在扩散池的上、下两室之间,角质层面向供给池,接受池加入为 33%乙醇生理盐水,供给室中加入药液 0.7 g,装置置于(36±0.5)℃恒温水浴中搅拌(210 r·min⁻¹),分别于 1,2,3,4,6,8,12,24 h 取样 2 mL,同时补加相同温度等体积新鲜接受液。样品在 6 000 r·min⁻¹离心 10 min 后,用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,取样品续滤液 20 μL 进行 HPLC 分析。

3 含量测定方法的建立

3.1 色谱条件 Hypersil-C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6

mm 5 μm); 流动相: 甲醇-水(75:25); 流速: 1 mL·min⁻¹; 检测波长: 321 nm; 柱温: 25 °C, 进样量: 20 μL。

3.2 标准曲线的制备 精密称取 Pd-Ia 21.0 mg, 用无水乙醇溶解(超声 5 min 助溶), 定容至 10 mL, 配成质量浓度为 2.10 mg·mL⁻¹ 的储备液, 精密量取 0.952 mL 储备液置于 10 mL 容量瓶中, 用空白大鼠皮肤浸出液稀释至刻度, 摇匀。再逐步稀释成 Pd-Ia 质量浓度为 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100 μg·mL⁻¹ 系列标准溶液, 离心后进样 20 μL。

4 数据处理

样品按照上述色谱条件进行含量测定, 计算单位时间内药物渗透量, 同时计算单位面积内药物累积渗透量, 以单位面积累积渗透量 ($Q_n, \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) 为纵坐标, 以时间 (t) 为横坐标, 得药物累积渗透曲线, 对所得曲线进行回归, 斜率即为药物的渗透速率 ($J, \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$)。采用 GraphPad Prism 5 软件对不同透皮促进剂组进行双样本 t 检验。

结 果

1 溶解度

Pd-Ia 溶解度测定结果见表 1。

表 1 Pd-Ia 在溶媒中的溶解度 $n=3 \bar{x} \pm s$

| 溶 媒 | 溶解度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ |
|---------------------|---------------------------------------|
| 水 | 5.57 ± 0.219 |
| 油酸 | 477.21 ± 79.472 |
| 33% 乙醇 | 458.43 ± 11.231 |
| 33% 乙醇/油酸 (v/v) | 790.04 ± 65.564 |

由表 1 可知, Pd-Ia 在水中的溶解度很小, 为难溶性药物; 在 33% 乙醇/油酸中溶解度最高。

2 接受液的筛选

Pd-Ia 在不同接受液中的溶解度见表 2。将大鼠皮肤分别在生理盐水(正常对照组)和 33% 乙醇生理盐水中浸泡 24 h, 固定染色, 皮肤组织切片在显

显微镜下观察, 结果见图 1。

表 2 Pd-Ia 在各种接受液中的溶解度

$n=3 \bar{x} \pm s$

| 接受液 | 溶解度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ |
|-----------------|---------------------------------------|
| 生理盐水 | 4.28 ± 0.277 |
| 10% 乙醇生理盐水 | 7.88 ± 0.146 |
| 20% 乙醇生理盐水 | 22.09 ± 2.947 |
| 30% 乙醇生理盐水 | 286.12 ± 4.029 |
| 33% 乙醇生理盐水 | 458.43 ± 11.231 |
| 10% PEG400 生理盐水 | 4.19 ± 0.182 |
| 20% PEG400 生理盐水 | 11.69 ± 1.367 |
| 30% PEG400 生理盐水 | 18.83 ± 0.277 |
| 35% PEG400 生理盐水 | 21.93 ± 2.163 |

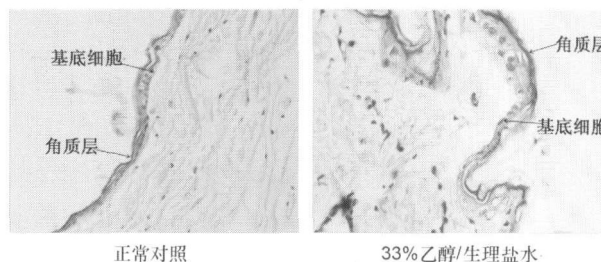


图 1 大鼠皮肤石蜡切片显微镜照片(×400)

由表 2 可知, Pd-Ia 在 33% 乙醇生理盐水中的溶解度最高, 为 458.43 μg·mL⁻¹, 其 pH 为 6.0, 接近于人体体液的 pH 值, 符合“漏槽条件”, 接受液使用前应超声脱气。如图 1 所示, 经 HE 染色法染色后, 大鼠皮肤石蜡切片在显微镜下观察到: 两者均没有使角质层脱离、表皮组织结构保持完整、没有改变皮肤的屏障结构, 结果与文献 [10] 报道相符。

3 方法学验证

3.1 专属性考察 大鼠皮肤 33% 乙醇生理盐水浸出液(空白)、对照品和样品离心, 经微孔滤膜过滤后进样, 按上述色谱条件进行测定, 色谱图见图 2。皮肤浸出液中的杂质不干扰 Pd-Ia 的含量测定, Pd-Ia 的保留时间约为 7.1 min。

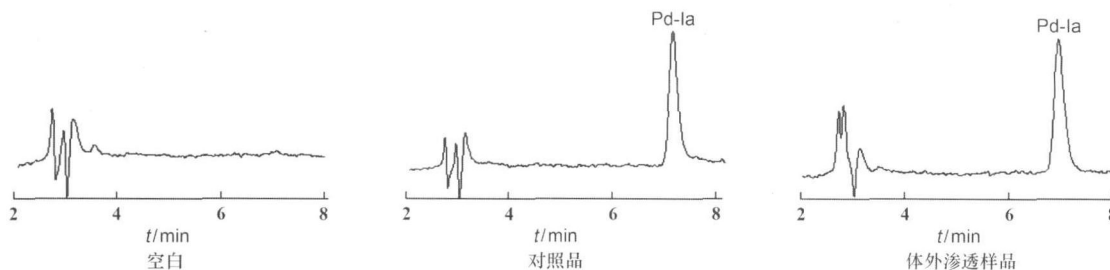


图 2 体外渗透样品的 HPLC 图

3.2 线性和检测限 以测得 Pd-Ia 峰面积 (A) 与其质量浓度 (C) 作线性回归, 得标准曲线方程为 $A = 24.481C + 5.6519$, $r = 0.9999$ ($n = 6$), 在 $1.0 \sim 100.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内呈良好线性关系。检测限为 $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

3.3 精密度和准确度 制备高、中、低 ($100, 10, 1.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 3 个质量浓度的 Pd-Ia 对照品溶液, 按上述色谱条件测定。平均准确度分别为 95.8% , 98.8% , 107.3% 。平行操作 5 次考察方法的日内精

密度, 重复操作 5 d 考察方法的日间精密密度, 结果日内 $\text{RSD} \leq 2.58\%$, 日间 $\text{RSD} \leq 2.12\%$, 说明该方法精密密度良好。

4 透皮促进剂的选择

4.1 单一透皮促进剂 (Azone) 与空白组比较, Azone 各剂量组经皮渗透速率均有显著性差异 ($P < 0.05$), 说明 Azone 对 Pd-Ia 有明显的促透作用, 1% Azone 的透皮促进作用最强, 经皮渗透速率为 $4.0637 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$, 见表 3 和图 3。

表 3 各浓度 Azone 促透效果

$n = 3 \bar{x} \pm s$

| 组别 | 渗透方程 | R | $J / \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ | 24 h 累积渗透量 / $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ |
|---------------------------|------------------------|--------|--|---|
| A (空白组) | $A = 2.8542C - 0.3813$ | 0.9975 | 2.8542 ± 0.181 | 67.628 ± 4.318 |
| B ₁ (1% Azone) | $A = 4.0637C - 2.4814$ | 0.9960 | 4.0637 ± 0.256^b | 92.097 ± 2.939^b |
| B ₂ (3% Azone) | $A = 3.3545C - 1.4127$ | 0.9990 | 3.3545 ± 0.201^a | 78.463 ± 5.039 |
| B ₃ (5% Azone) | $A = 3.8585C - 1.5858$ | 0.9990 | 3.8585 ± 0.238^b | 89.752 ± 1.837^b |
| B ₄ (7% Azone) | $A = 3.4263C - 0.5966$ | 0.9960 | 3.4263 ± 0.139^b | 79.349 ± 3.443^b |

与空白组比较 a: $P < 0.05$ b: $P < 0.01$

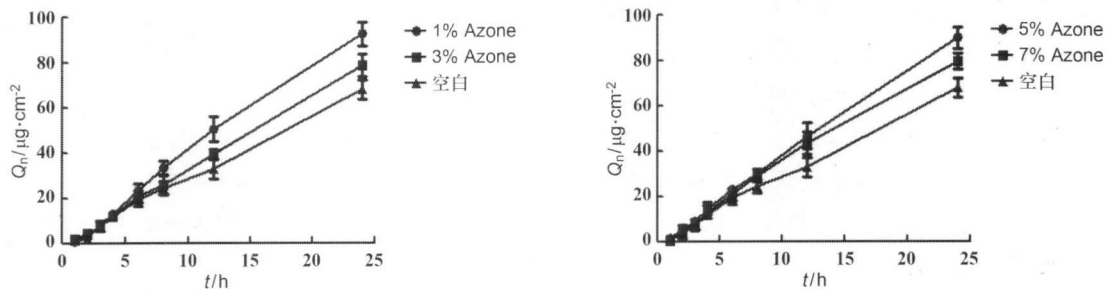


图 3 不同浓度 Azone 对 Pd-Ia 经皮渗透速率影响

4.2 Azone 与 PG 混合透皮促进剂 以 1% Azone 分别与 10%, 15% PG 联用作为混合透皮促进剂。与空白组比较, 其渗透速率均有显著性差异 ($P < 0.05$)。1% Azone + 15% PG 的促透效果比其他任何组的促透效果好, 经皮渗透速率达 4.8894

$\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$, 与 1% Azone 组比较, 其 24 h 累积渗透总量增大, 有显著性差异 ($P < 0.05$), 渗透速率增大, 但没有显著性差异, 见表 4 和图 4, 表明 1% Azone 与 15% PG 联合使用可以产生协同作用。

表 4 Azone 与不同浓度 PG 混合透皮促进剂的促透效果

$n = 3 \bar{x} \pm s$

| 组别 | 渗透方程 | R | $J / \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ | 24 h 累积渗透量 / $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ |
|------------------------|------------------------|--------|--|---|
| A (空白组) | $A = 2.8542C - 0.3813$ | 0.9975 | 2.8542 ± 0.181 | 67.628 ± 4.318 |
| C1 (1% Azone + 5% PG) | $A = 3.7938C + 2.0036$ | 0.9945 | 3.7938 ± 0.634 | 89.715 ± 5.550 |
| C2 (1% Azone + 10% PG) | $A = 4.1406C + 2.6385$ | 0.9975 | 4.1407 ± 0.402^a | 99.875 ± 9.024^a |
| C3 (1% Azone + 15% PG) | $A = 4.8894C + 10.642$ | 0.9915 | 4.8894 ± 0.481^a | 123.152 ± 12.174^{ab} |

与空白组比较 a: $P < 0.01$; 与 1% Azone 组比较 b: $P < 0.05$

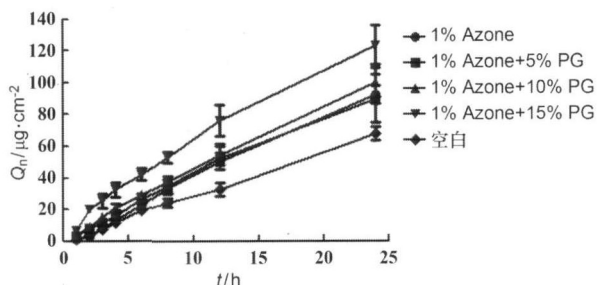


图4 1% Azone 与不同浓度 PG 混合透皮促进剂对 Pd-Ia 经皮渗透速率影响

讨论

对于水溶性低的药物,常在在接受液中加入一些醇类或非离子型表面活性剂等来增加药物的溶解度。本试验筛选得到 33% 乙醇/生理盐水作为接受液,具有良好的接受药物能力,又能保持皮肤屏障结构,但是,长时间浸泡在水溶液中,皮肤组织表皮细胞发生了水合作用,均有不同程度膨胀,变大;选择 33% 乙醇/油酸作为供给液的溶剂,尽可能增大 Pd-Ia 的溶解度,减少溶剂对大鼠皮肤结构的影响,并且能提高 Azone 的促透作用。

本文考察了目前最常用的合成类透皮促进剂 Azone 对 Pd-Ia 的透皮促进作用。一般认为 Azone 对类脂有特异性的溶解作用,破坏类脂所形成的膜,使毛囊口拓宽,促进药物通过毛干与毛囊壁之间的微孔隙和皮脂腺到达真皮;它主要作用于细胞类脂双分子层,增加双分子层的流动性,促进了药物通过细胞间的扩散^[11]。Azone 的促透作用不一定会随浓度的增大而增加,有效浓度常在 1% ~ 6% 左右,其最佳浓度与药物的物理化学性质及所用的介质有关^[12]。由实验结果可知,单独使用 Azone 的最佳浓度为 1%,因此,选用 1% Azone 与不同浓度 PG 作为混合透皮促进剂。

Azone 与其他透皮促进剂合用常有更佳效果^[12]。当 Azone 与 PG 混合使用时,PG 分布在类脂极性基团之间的亲水性区域,使它容易分配进入细胞间部位,PG 还可以促进药物通过细胞内途径转运^[11],增加在角质层的溶解度,从而使角质层的有序性下降,扩散速率提高^[13],因此可以提高 Azone 的促透作用。

本文结果表明,1% Azone 与 15% PG 合用对 Pd-Ia 的透皮促进作用最大,体现出了协同作用,可供 Pd-Ia 经皮给药制剂研究作参考。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 2010 年版. 一部. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 248.
- [2] 潘淳. 中药前胡质量控制的研究概况[J]. 华夏医学, 2004, 17(5): 862 - 864.
- [3] LI JM, CHANG TH, SUN XD, *et al.* Effect of dl-praeruptorin A on calcium current in ventricular cells of guinea pig[J]. *Acta Pharmacologica Sinica*, 1994, 15(6): 525 - 527.
- [4] 王丽娟, 李金鸣, 常天辉, 等. 白花前胡甲素对豚鼠心肌单细胞迟发性外向钾电流的影响[J]. 中国药理与毒理杂志, 1995, 9(3): 192 - 195.
- [5] 杨武双, 滕伯刚, 杨立朝, 等. 前胡甲素对小鼠局灶性脑缺血的保护作用[J]. 中国生化药物杂志, 2010, 31(2): 118 - 121.
- [6] 常天辉, 刘晓阳, 章新华, 等. 白花前胡及前胡甲素对心肌缺血再灌注大鼠 IL-6 水平及 Fas, bax, bcl-2 蛋白表达的影响[J]. 中国医科大学学报, 2003, 32(1): 1 - 6.
- [7] 刘晓阳, 常天辉. 白花前胡甲素对急性缺血再灌注大鼠心肌及 Fas 蛋白及血清 IL-6 水平的影响[J]. 沈阳药科大学学报, 2002, 19(5): 348 - 351.
- [8] ZHANG Z, LIU YY, SU MQ, *et al.* Pharmacokinetics, tissue distribution and excretion study of dl-praeruptorin A in rats by liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. *Phytomedicine*, 2011, 18(6): 527 - 532.
- [9] 贾伟, 高文远. 药物控释新剂型[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 145 - 146.
- [10] PANCHAGNULA R, DESU H, JAIN A, *et al.* Effect of lipid bilayer alteration on transdermal delivery of a high-molecular-weight and lipophilic drug: studies with paclitaxel[J]. *J Pharm Sci*, 2004, 93(9): 2177 - 2183.
- [11] 陆彬. 药物新剂型与新技术[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 523 - 524.
- [12] 颜耀东. 缓释控释制剂的设计与开发[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2006: 424 - 425.
- [13] 杨华生, 王乃捷, 梁秉文. 蒿甲醚贴剂的研制及小鼠体内药效学研究[J]. 中国药学杂志, 2008, 43(24): 1878 - 1881.

编辑: 郭超伟/接受日期: 2011 - 08 - 10