

电致孔方式对盐酸青藤碱经皮渗透的促进作用

鄢森¹, 滕健², 孙彤彤³, 许李², 仇萍², 汪晴^{1*}

(1. 大连理工大学化工学院, 精细化工国家重点实验室, 辽宁大连 116024;

2. 湖南正清制药集团股份有限公司, 湖南怀化 418005;

3. 大连科翔科技开发有限公司, 辽宁大连 116024)

[摘要] 目的: 考察盐酸青藤碱(SNH)的经皮渗透性, 并通过优化电致孔参数以达到对SNH最佳促渗作用。方法: 采用体外扩散池法研究SNH的经皮渗透性及电致孔的促渗作用, 并通过小鼠在体试验进一步评估电致孔的促渗效果。结果: 在稳态条件下, SNH在裸鼠去角质皮肤和全皮中的渗透速率分别为 (385.81 ± 12.88) , $(0.88 \pm 0.20) \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$, 去角质皮肤中的渗透速率约为全皮中的438倍; 渗透动力学分析结果表明, SNH在角质层中的溶解度和扩散系数都较低, 分别为 $(70.82 \pm 9.63) \times 10^3 \text{ g} \cdot \text{m}^{-3}$ 和 $(3.07 \pm 1.52) \times 10^{-14} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$; 在优化的电致孔条件(电压72 V, 时间60 min)下, SNH在小鼠皮肤中的24 h累积渗透量达到 $(10\ 008.39 \pm 1\ 961.57) \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$, 稳态渗透速率达 $(456.01 \pm 51.26) \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$, 与空白组相比分别提高了5.4倍和5.1倍, 皮肤和肌肉中SNH的滞留量分别为空白组的2.0倍和1.5倍。结论: SNH在角质层中较低的溶解度和扩散系数是阻碍其经皮渗透的主要因素, 电致孔可显著提高SNH的经皮渗透, 并可以增加SNH在小鼠皮肤和肌肉中的滞留量。

[关键词] 盐酸青藤碱; 体外渗透; 电致孔; 全皮; 去角质皮肤; 体外扩散池法

[中图分类号] O552.2; R94; R28; O657.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)17-0146-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20211448 **[增强出版附件]** 内容详见 <http://www.syfjxzz.com> 或 <http://cnki.net>

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20210407.1438.002.html>

[网络出版日期] 2021-04-07 17:01

Effect of Electroporation on Percutaneous Permeation of Sinomenine Hydrochloride

YAN Sen¹, TENG Jian², SUN Tong-tong³, XU Li², QIU Ping², WANG Qing^{1*}

(1. State Key Laboratory of Fine Chemicals, School of Chemical Engineering,

Dalian University of Technology, Dalian 116024, China;

2. Hunan Zhengqing Pharmaceutical Group Co. Ltd., Huaihua 418005, China;

3. Dalian Kexiang Technology Development Co. Ltd., Dalian 116024, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the percutaneous permeability of sinomenine hydrochloride (SNH) and optimize the parameters of electroporation to achieve the best permeation enhancing effect on SNH. **Method:** The percutaneous permeability of SNH and the enhancement effect of electroporation were studied by *in vitro* diffusion cell method, and the enhancement effect of electroporation was further evaluated by *in vivo* study in mice. **Result:** Under steady-state condition, the permeation rates of SNH in stripped skin and intact skin of hairless mice were (385.81 ± 12.88) , $(0.88 \pm 0.20) \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$, respectively. The permeation rate in stripped skin was 438 times higher than that in intact skin. The results of percutaneous permeation kinetics analysis showed that the solubility and diffusion coefficient of SNH in stratum corneum were relatively low, which were $(70.82 \pm 9.63) \times 10^3 \text{ g} \cdot \text{m}^{-3}$ and $(3.07 \pm 1.52) \times 10^{-14} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, respectively. Under the optimized electroporation conditions (voltage of 72 V, time of 60 min), the 24 h cumulative permeation amount of SNH

[收稿日期] 20201224(007)

[基金项目] 湖南省科技创新重大项目(2020SK1020)

[第一作者] 鄢森, 在读硕士, 从事经皮给药制剂研究, E-mail: yansen_dlut@126.com

[通信作者] *汪晴, 博士, 教授, 博士生导师, 从事经皮给药及经黏膜给药系统的研究与相关制剂的开发, E-mail: qwang@dlut.edu.cn

through skin of mice was $(10\ 008.39 \pm 1\ 961.57) \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$, and the steady-state permeation rate was $(456.01 \pm 51.26) \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$, which were 5.4 times and 5.1 times higher than those of blank group, respectively. *In vivo* studies in mice showed that the contents of SNH in skin and muscle of electroporation group were 2.0 times and 1.5 times higher than those of blank group. **Conclusion:** The low solubility and low diffusion coefficient of SNH in the stratum corneum are the main factors hindering the percutaneous permeation of SNH. Electroporation can significantly increase the percutaneous permeation of SNH and its retention in skin and muscle of mice.

[Keywords] sinomenine hydrochloride; percutaneous permeation *in vitro*; electroporation; intact skin; stripped skin; *in vitro* diffusion cell method

青藤碱(SN)是从清风藤中提取分离得到的一种生物碱单体,具有抗炎、镇痛和免疫抑制等作用^[1-2]。正清风痛宁注射液是临床上用于治疗风湿及类风湿性关节炎的常用制剂,其有效成分为盐酸青藤碱(SNH),但在临床使用过程中患者依从性较差。经皮给药可以使药物以一定速率通过皮肤,经皮下毛细血管吸收进入体循环或者直达皮下局部组织器官病灶,从而起到全身或局部治疗作用。相较于其他给药方式,经皮给药能够避免肝脏首过效应和胃肠道或局部肌肉的刺激性,提高患者的依从性^[3]。经皮递送SNH是一种无痛稳定的给药方式,能使SNH富集于皮下局部组织病灶,同时减少各种全身不良反应^[4]。但SNH较低的经皮渗透能力是限制其在皮肤局部应用的主要障碍^[5-6]。

改善药物的经皮渗透性,通常采用化学促渗法和/或物理促渗法。化学促渗法是通过加入化学促渗剂来提高药物制剂的释放度或渗透性的有效方法。杨永钢等^[6]制备了一种含有10%肉豆蔻酸异丙酯和5%薄荷醇的SN透皮贴片,SN经大鼠皮肤的稳态渗透速率为 $(24.16 \pm 1.46) \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$,24 h累积透过量比不含有促渗剂的贴片提高了8.22倍,但达到有效治疗浓度仍需较长时间。电致孔法(EP)作为物理促渗方法的一种,被越来越广泛地应用于经皮给药中。该技术主要是采用瞬时电脉冲作用于表皮,有研究证明,EP使角质层(SC)内产生了直径10 nm以下可逆的亲水性孔道,降低了药物在SC中的扩散阻碍^[7-8]。李凡等^[9]采用EP技术促进SN巴布剂的经皮渗透,研究结果表明在家兔体内实验中,药时曲线下面积(AUC_{0-∞})为被动扩散的1.32倍,药峰浓度(C_{max})为被动扩散的1.24倍,达峰时间(t_{max})比被动扩散提前4 h,证明EP能够提高SN透皮吸收的速度和程度。说明EP的应用可以缩短给药时间,使药物快速穿过皮肤^[8],提高生物利用度。

目前已有研究证明了EP对SNH的促渗作用,但皮肤对EP电压和电流的耐受能力是有限的,较高

的电压和电流会影响SNH经皮给药的安全性^[10-12]。因此,本研究拟采用体外经皮渗透试验和渗透动力学分析方法,考察并分析SNH经皮渗透能力低下的原因,在此基础上,运用电子脉冲治疗仪研究不同参数条件下EP对SNH体外经皮渗透的影响,评价其在体试验的有效性和安全性,旨在开发出一种EP促进SNH经皮渗透的新方法。

1 材料

LC-20AT型高效液相色谱仪(日本岛津公司),FSH-2型可调高速匀浆机(金坛市宏华仪器厂),KX-V/HDP数控型体外经皮渗透试验系统(大连科翔科技开发有限公司),BSA124S型1/1万电子天平和SOP型1/10万电子天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司],CHY-5型测厚仪(济南三泉中石实验仪器有限公司),LHJ-IX型电子脉冲治疗仪(长沙原道医药科技开发有限公司)。SNH原料药、正清风痛宁注射液(湖南正清制药集团股份有限公司,批号分别为YK-190509,1907401),SN对照品(中国食品药品检定研究院,批号110774-201808,纯度94.6%),磷酸二氢钠、水合氯醛和聚乙二醇(PEG)400(国药集团化学试剂有限公司,批号分别为20160323,20180912,20180808),水为娃哈哈纯净水,甲醇、乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

雄性昆明种小鼠和BALB/c-nu裸鼠,SPF级,体质量(20±2) g,购自辽宁长生生物技术股份有限公司,合格证号SCXK(辽)2020-0001。本文涉及的动物实验经大连理工大学生物与医学伦理委员会批准,批准号2021-059。实验前动物于大连理工大学药理学系SPF级动物房内适应性饲养1周。

2 方法与结果

2.1 高效液相色谱法(HPLC)的建立

2.1.1 色谱条件 InterSustain® C₁₈色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相乙腈-0.78%磷酸二氢钠溶液(12:88),检测波长265 nm,流速1.0 mL·min⁻¹,柱温30 °C,进样量5 μL。

2.1.2 对照品溶液的配制 精密称定SN对照品18.92 mg,加入适量甲醇,超声使溶解(功率200 W,频率53 kHz,下同),放冷后用甲醇定容至50 mL,得378.4 mg·L⁻¹对照品贮备液;用2.1.1项下流动相将贮备液分别稀释成质量浓度为0.473, 0.946, 1.892, 9.46, 18.92, 47.3, 94.6, 189.2 mg·L⁻¹的对照品溶液。

2.1.3 线性关系考察 使用2.1项下系列质量浓度的对照品溶液,按2.1.1项下色谱条件检测,以峰面积为纵坐标,SN质量浓度为横坐标,进行线性回归,得回归方程 $Y=5\ 023.61X+316.279$ ($R^2=0.999\ 9$),线性范围0.473~378.4 mg·L⁻¹。

2.1.4 专属性考察 使用小鼠皮肤的甲醇提取液,2.1.2项下配制的SN对照品溶液和空白接受液,按2.1.1项下色谱条件进行检测,色谱图见网络附件材料。结果发现建立的条件对SN定量分析无干扰。

2.2 表观油水分配系数的测定 取适量SNH加至2 mL正辛醇饱和的水溶液中,使其完全溶解,加入水饱和正辛醇2 mL,于(25±0.5) °C磁力搅拌24 h,经1万 r·min⁻¹离心10 min(离心半径6 cm,下同),分离出油相和水相,并分别经适当稀释后按照2.1.1项下色谱条件测定($n=6$),按公式 $\lg P=\lg(C_o/C_w)$ 计算油水分配系数(P),式中 C_o 为平衡后正辛醇相中药物质量浓度, C_w 为平衡后水相中药物质量浓度。结果SNH的 $\lg P=-2.04\pm 0.04$,表明该药物亲水性强。

2.3 离体皮肤的制备^[13]

2.3.1 小鼠和裸鼠全皮 采用脱颈法处死小鼠和/或裸鼠,剔除小鼠背部毛发,迅速剥离小鼠和/或裸鼠背部皮肤,去除皮下脂肪和结缔组织,裁剪制备成2 cm×2 cm面积的小块,确保皮肤SC完整不被损坏,塑封包装后于-80 °C保存,1个月内使用。使用前,皮肤于4 °C解冻后恢复至室温并测量其厚度。

2.3.2 裸鼠去角质皮肤 裸鼠全皮解冻并恢复至室温后,采用胶带剥离法除去裸鼠皮肤SC,共剥离30次以确保SC完全去除,测量去角质皮肤的厚度。

2.4 SNH经皮渗透动力学研究

2.4.1 供给液与接受液 将过量的SNH加至40% PEG400水溶液中,37 °C下磁力搅拌24 h,制成饱和溶液,得供给液。接受液为40% PEG400水溶液。

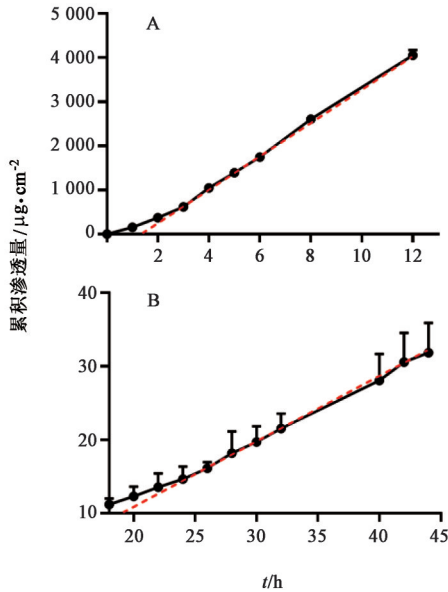
2.4.2 SNH在皮肤匀浆中稳定性考察 取2.3项下裸鼠全皮,剪碎后置于10 mL离心管中,加入40% PEG400水溶液1 mL,用高速匀浆机于1万 r·min⁻¹匀浆10 min将皮肤打碎,补充加入40% PEG400水溶液4 mL,于37 °C下孵育30 min使皮肤中酶游离,于3 000 r·min⁻¹离心10 min,取上清液,经0.45 μm

微孔滤膜滤过,作为溶剂。向其中加入一定量SNH,振荡使药物充分溶解及混合,置于(37±1) °C水浴条件下,分别于0, 3, 6, 9, 12, 24, 30, 36, 48 h取样0.2 mL,按2.1.1项下色谱条件测定,计算48 h内SNH峰面积的RSD 0.8%,说明SNH在该实验条件下48 h内稳定性良好。

2.4.3 体外渗透研究^[14] 将2.3项下裸鼠全皮和去角质皮肤固定在水平双室扩散池的供给室和接受室之间(SC面向供给室),加入供给液[SNH溶解度为(92.36±0.54) g·L⁻¹]和接受液。实验过程中控制温度为(37±0.2) °C,于(600±6) r·min⁻¹磁力搅拌,并确保在实验过程中供给室内药物溶液处于饱和状态(一直有未溶解的药物存在)。根据体外渗透预试验结果,在稳态渗透条件下,全皮组分别于18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 37, 40, 42, 44 h从接受室中取样1 mL;去角质皮肤组分别于1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 12 h从接受室中取样1 mL,均补加等温等体积的空白接受液,平行3组。按2.1.1项下色谱条件测定,按照 $Q=[C_nV+V_0(C_1+C_2+C_3+\dots+C_i)]/A$ ($i=1, 2, 3, \dots, n$)计算单位面积累积渗透量($Q, \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$),式中 C_n 和 C_i 分别为第 n, i 个取样点测得的药物质量浓度(mg·L⁻¹), V 为接受室体积(12 mL), V_0 为单次取样体积(1.0 mL), A 为渗透面积(1.77 cm²)。绘制 Q -时间(Q - t)曲线。在 Q - t 曲线中,稳态部分拟合直线斜率为稳态渗透速率(J),该直线与横坐标的截距为时滞(t_{lag})。

按公式 $C_s=6t_{\text{lag},w}(1-3\tau+2\eta\tau)(dQ/dt)_w/[(1+2\eta)(1-\eta)h_s]$, $C_v=6t_{\text{lag},v}(dQ/dt)_v/h_v$, $D_s=h_s(dQ/dt)_w/C_s/(1-\eta)$, $D_v=6t_v(dQ/dt)_v/C_v$, $\eta=(dQ/dt)_w/(dQ/dt)_v$, $\tau=t_{\text{lag},v}/t_{\text{lag},w}$, $K_{s/v}=C_s/C_v$ 计算SNH经皮渗透动力学参数^[15]。式中 D 和 K 分别为扩散系数和分配系数, C 为药物质量浓度(g·L⁻¹), h 为皮肤厚度(cm), η 为药物在全皮和去角质皮肤中稳态渗透速率之比, τ 为药物在去角质皮肤和全皮中时滞之比;下标 s, w, v 分别指SC,全皮和去角质皮肤。SNH饱和溶液的体外经皮渗透曲线见图1。SNH经去角质皮肤的 $Q_{12\text{h}}$ 和经全皮的 $Q_{44\text{h}}$ 分别为(4 058.15±119.41), (31.84±4.04) μg·cm⁻²,稳态渗透速率(J_v 和 J_w)分别为(385.81±12.88), (0.88±0.20) μg·cm⁻²·h⁻¹,均呈现显著性差异($P<0.01$),说明SC是药物经皮渗透的主要屏障。SNH在SC和去角质皮肤中扩散系数(D_s 和 D_v)分别为(3.07±1.52) ×10⁻¹⁴, (1.25±0.31) ×10⁻¹² cm²·s⁻¹, D_v 高于 D_s 约有2个数量级,说明SNH在SC中较低的扩散性是形成SC屏障的主要原因。

此外, SNH在SC中的溶解度(C_s)仅为 $(70.82 \pm 9.63) \times 10^3 \text{ g} \cdot \text{m}^{-3}$,也可能在一定程度上阻碍了药物经皮渗透。另一方面, SNH的SC与活性表皮之间的分配系数($K_{s/v}$)为0.004,表明强亲水性的SNH更容易从SC分配进入活性表皮。



A. 去角质皮肤; B. 全皮

图1 SNH饱和溶液透过裸鼠皮肤的体外渗透曲线($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 1 *In vitro* permeation profiles of SNH saturated solution through hairless mouse skin ($\bar{x} \pm s, n=3$)

2.5 EP体外促渗研究 根据2.4项下结果, SNH经皮渗透能力较低的原因之一是药物在SC中扩散系数过低,故采用EP提高SNH在SC中的扩散能力。

2.5.1 EP施加方式考察 将2.3项下小鼠皮肤固定在立式扩散池的供给室和接受室之间(SC面朝上),电子脉冲治疗仪调节电压为90V,设置EP时间为60min,分别考察EP不同施加方式对SNH经皮渗透的影响。实验装置示意图见图2。

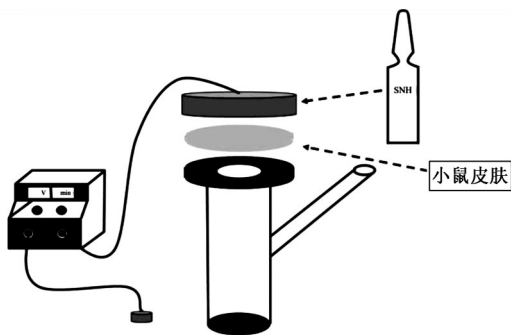


图2 电致孔实验装置示意

Fig. 2 Experimental device of electroporation

方法一为EP预处理皮肤,然后立即撤去电子脉冲治疗仪,向供给室中加入1支正清风痛宁注射液

(规格50mg/2mL)作为供给液;方法二为EP与SNH同时应用于皮肤(同时处理组),即将供给液加入到皮肤电极中进行EP促渗。接受液均为40%PEG400水溶液,在 $(600 \pm 6) \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 磁力搅拌和 $(37 \pm 0.2) \text{ }^\circ\text{C}$ 条件下进行实验。在预定时间点(1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24h)从接受室中取样0.2mL并补加等温等体积的空白接受液,平行3组。按2.1.1项下条件测定,计算 Q ,绘制 $Q-t$ 曲线,见表1和图3。结果与空白组比较,EP预处理皮肤组的 $Q_{24\text{h}}$ 和 J 略有增加,但差异无统计学意义,同时处理组则显著增加($P < 0.01$),说明EP对SNH经皮渗透有显著促渗作用。

表1 电致孔不同施加方式下SNH的经皮渗透参数比较($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 1 Comparison of percutaneous permeability parameters of electroporation with different application methods ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	$Q_{24\text{h}}/\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$	$J/\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$	t_{lag}/h
空白	$1\ 840.17 \pm 146.96$	89.28 ± 8.00	3.39 ± 0.23
预处理	$2\ 426.60 \pm 359.20$	105.94 ± 6.30	$1.07 \pm 0.19^{1)}$
同时处理	$7\ 768.18 \pm 1\ 095.53^{2)}$	$325.00 \pm 42.00^{2)}$	$0.10 \pm 0.03^{2)}$

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (表2,3同)。

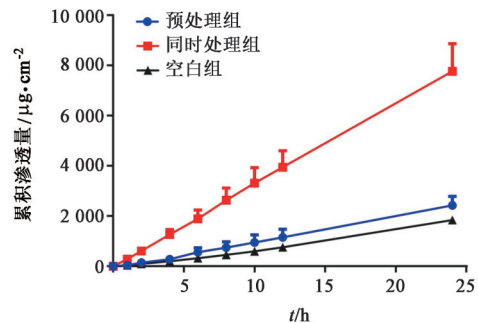


图3 不同电致孔施加方式下SNH的经皮渗透行为($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 3 Percutaneous permeation behaviors of SNH with different electroporation methods ($\bar{x} \pm s, n=3$)

2.5.2 EP电压参数考察 采用EP与SNH同时应用于皮肤表面的方式,考察不同电压参数的影响。分别设定EP电压为0, 18, 36, 54, 72, 90V, EP施加时间均为60min,其余条件和方法同2.5.1项,见图4和表2。结果发现随着电压的升高,SNH的 $Q_{24\text{h}}$ 和 J 随之先增大后降低;与空白组比较,当电压 $\geq 18\text{V}$ 时二者明显升高($P < 0.05, P < 0.01$),当电压为72V时, $Q_{24\text{h}}$ 和 J 均达到最大值;EP对人体皮肤的安全电压阈值为 $300\text{V}^{[16]}$,因此,选择电压参数为72V进行后续研究可以同时满足安全性和有效性的要求。

2.5.3 EP时间参数考察 采用上述优化条件考察EP施加时间对SNH经皮渗透的影响。分别设定EP施加时间为0, 20, 40, 60min,其余条件和方法同2.5.1项,见表3。结果发现与空白组相比,EP施加

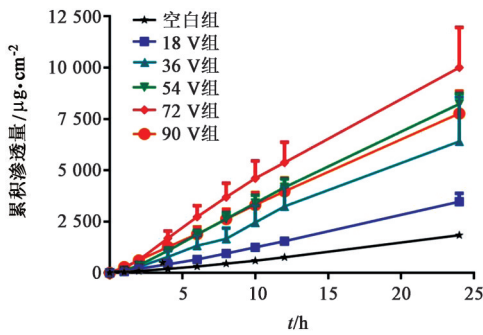


图4 不同电致孔电压参数下SNH的经皮渗透行为($\bar{x}\pm s, n=3$)
Fig. 4 Percutaneous permeation behaviors of SNH with different voltage parameters of electroporation ($\bar{x}\pm s, n=3$)

表2 电致孔不同电压参数下SNH的经皮渗透参数($\bar{x}\pm s, n=3$)
Table 2 Percutaneous permeation parameters of SNH with different voltage parameters of electroporation ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	$Q_{24h}/\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$	$J/\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$	t_{lag}/h
空白	1 840.17±146.96	89.28±8.00	3.39±0.23
18 V	3 469.90±408.63 ¹⁾	157.05±16.83 ²⁾	1.97±0.42 ¹⁾
36 V	6 411.82±2 151.80 ¹⁾	288.92±29.63 ²⁾	1.70±0.34 ¹⁾
54 V	8 233.59±503.01 ²⁾	351.06±40.58 ²⁾	0.45±0.22 ²⁾
72 V	10 008.39±1 961.57 ²⁾	456.01±51.26 ²⁾	0.10±0.05 ²⁾
90 V	7 768.17±1 095.58 ²⁾	325.00±49.88 ²⁾	0.10±0.03 ²⁾

时间超过40 min时, SNH的 Q_{24h} 和 J 明显升高($P<0.05, P<0.01$), 其中当时间为60 min时SNH的 Q_{24h} 和 J 分别增加了5.4, 5.1倍; 同时, 为了保证安全性, 在经皮给药时EP的连续使用一般不超过60 min。由此, 筛选出最佳的EP施加时间为60 min。

表4 电致孔介导下小鼠在体皮肤和肌肉中SNH滞留量($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	给药1 d		给药2 d		给药3 d	
	皮肤	肌肉	皮肤	肌肉	皮肤	肌肉
空白	3.03±0.47	1.82±0.14	2.61±1.45	1.87±0.78	3.64±0.88	1.98±0.10
电致孔	6.20±0.91 ¹⁾	2.82±0.13 ¹⁾	5.43±0.38 ¹⁾	2.84±0.16	6.94±0.18 ²⁾	2.70±0.11 ¹⁾

注: 与同天同部位空白组比较¹⁾ $P<0.05, ^2)$ $P<0.01$ 。

3 讨论

本文通过SNH小鼠体外经皮渗透试验和在体试验评估EP对SNH的经皮促渗作用。由体外渗透性研究结果可见, SNH经全皮的 Q 远低于去角质皮肤, 同时对SNH经皮渗透动力学参数分析可知, 在渗透过程中, D_s 仅约为 D_v 的1/40, 表明SNH在SC中的扩散能力远低于在去角质皮肤(活性表皮)中, 说明SC是限制SNH经皮渗透的最主要因素。其原因推测是SNH的强亲水性使其难以扩散进入SC中, 从而阻碍其经皮吸收。

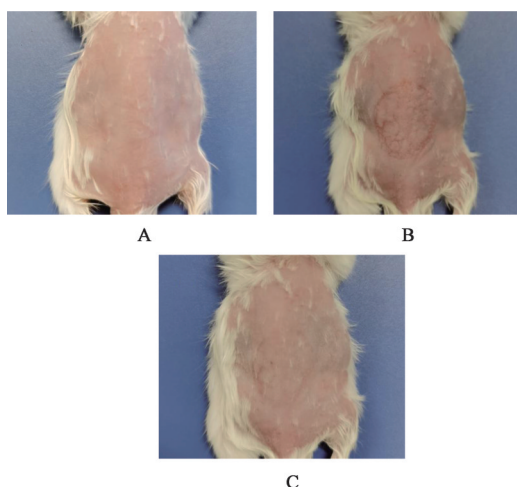
表3 电致孔不同施加时间下SNH的经皮渗透参数($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 3 Percutaneous permeation parameters of SNH with different application times of electroporation ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	$Q_{24h}/\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$	$J/\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$
空白	1 840.17±146.96	89.28±8.00
20 min	2 416.75±714.64	103.43±18.96
40 min	3 590.18±570.95 ¹⁾	155.71±25.67 ²⁾
60 min	10 008.39±1 961.57 ²⁾	456.01±51.26 ²⁾

2.6 EP在体促渗试验 基于EP体外促渗优化条件, 选择小鼠进行在体促渗试验。腹腔注射4%水合氯醛麻醉小鼠, 剔除背部毛发, 将皮肤电极固定于小鼠背部无毛区域, SNH给药剂量 $50\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ [17]。EP施加电压72 V, 施加时间60 min。按临床常见给药频率, 每日给药1次, 分别考察给药1, 2, 3 d后皮肤和肌肉中药物质量浓度和皮肤状态变化, 平行6组。皮肤给药60 min后, 立即取下给药区域皮肤和肌肉, 剪碎后加甲醇1 mL, 超声60 min, 经 $0.45\ \mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过, 按2.1.1项下条件测定, 见表4。结果发现给药1 d时, 采用EP皮肤给药能明显提高小鼠皮肤和肌肉中SNH的滞留量($P<0.05$), 分别为空白组的2.0, 1.5倍; 连续多天给药组显示出相似的效果, 且未产生皮肤中药物累积, 推测在小鼠体内, 药物24 h内可被代谢, 这与SNH的短半衰期(5~6 h)一致[18]。在该实验条件下, 观察小鼠皮肤变化情况, 在体施加EP后, 小鼠皮肤可在短时间内恢复正常状态, 且未出现皮肤红肿、破损等现象, 见图5。

EP施加方式对SNH经皮渗透有很大影响。药物与EP同时应用于皮肤时(同时处理组), SNH的 t_{lag} 较空白组显著降低, 其可在较短时间内以较高的渗透速率持续稳定穿过皮肤; 而EP预处理皮肤并未对SNH表现出明显的促渗效果, 说明在本实验条件下, EP对皮肤渗透性的影响具有可逆性特征, 其促渗作用具有时效性。在本研究中, 施加电压72 V和施加时间60 min时, SNH的渗透能力达到最大, Q_{24h} 和 J 分别为空白组的5.4, 5.1倍, 而且实验小鼠的皮肤可以在60 min内恢复正常。在目前的经皮给药



A. EP皮肤给药前; B. EP皮肤给药结束后; C. EP皮肤给药结束后1 h

图5 小鼠皮肤在体施加EP前后皮肤状态

Fig. 5 Skin state of mice before and after electroporation

研究和临床使用中,多为200~500 V, 5~10 min和90~120 V, 30 min的方式^[10-11, 19-20],对皮肤表面施加的高电压可能会引起肌肉收缩等不良反应^[7],而本文采用低电压EP方式有望提高皮肤安全性,同时又具有显著的促渗作用。本研究结果表明,采用较低电压的EP促进SNH经皮吸收具有良好应用前景。由于小鼠皮肤与人体皮肤差异较大,为了进一步验证低电压EP方式对人体皮肤的安全性和有效性,后续将采用人体皮肤进行体外试验和临床研究。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] 孙越华,朱清,李俊旭. 青藤碱抗炎免疫与抗肿瘤作用研究新进展[J]. 中国药理学通报, 2015, 31(8): 1040-1043.

[2] 唐琳,林也,刘乐平,等. 青藤碱抗肿瘤作用与分子机制研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(4): 175-185.

[3] AMEEN D, MICHNIAK K B. Development and *in vitro* evaluation of pressure sensitive adhesive patch for the transdermal delivery of galantamine: Effect of penetration enhancers and crystallization inhibition[J]. Eur J Pharm Biopharm, 2019, 139: 262-271.

[4] PAUDEL K S, MILEWSKI M, SWADLEY C L, et al. Challenges and opportunities in dermal/transdermal delivery[J]. Ther Deliv, 2010, 1(1): 109-131.

[5] 姜翠敏,王旋. 青藤碱游离碱凝胶体外经皮渗透特性研究[J]. 中国药房, 2008, 19(30): 2330-2332.

[6] 杨永钢,赵利刚,杨永铁,等. 青藤碱压敏胶分散型贴剂的制备及体外经皮渗透性考察[J]. 沈阳药科大学

学报, 2009, 26(1): 11-14, 22.

[7] DENET A R, VANBEVER R, PRÉAT V. Skin electroporation for transdermal and topical delivery [J]. Adv Drug Deliver Rev, 2004, 56(5): 659-674.

[8] DEMIRYUREK Y, NICKAEEN M, ZHENG M, et al. Transport, resealing, and re-poration dynamics of two-pulse electroporation-mediated molecular delivery [J]. Biochim Biophys Acta, 2015, 1848(8): 1706-1714.

[9] 李凡,郝保华,李伟泽,等. 电致孔条件下巴布剂中青藤碱透皮吸收的药动学研究[J]. 第二军医大学学报, 2008, 29(9): 1096-1098.

[10] 李波,胡燕,刘敏萍,等. 正清风痛宁电致孔给药肾俞、邱氏穴在肾绞痛治疗中的应用[J]. 中国当代医药, 2018, 25(4): 171-173, 176.

[11] 王多诚,郭虹,吕健,等. 探析正清风痛宁注射液电致孔技术在颈椎病康复治疗中的应用[J]. 世界最新医学信息文摘, 2016, 16(81): 140, 147.

[12] VANBEVER R, PRÉAT V V. *In vivo* efficacy and safety of skin electroporation [J]. Adv Drug Deliv Rev, 1999, 35(1): 77-88.

[13] JUNG E C, MAIBACH H I. Animal models for percutaneous absorption [J]. J Appl Toxicol, 2015, 35(1): 1-10.

[14] 江茂源,林夏,杨莎莎,等. 基于溶出特性评价附子理中丸的剂型特征[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(24): 15-22.

[15] TOJO K, CHIANG C C, CHIEN Y W. Drug permeation across the skin: effect of penetrant hydrophilicity [J]. J Pharm Sci, 1987, 76(2): 123-126.

[16] 唐斌斌. 秦艽多成分在电致孔作用下的透皮研究 [D]. 西安:西北大学, 2009.

[17] YAN H, YAN M, LI H D, et al. Pharmacokinetics and penetration into synovial fluid of systemical and electroporation administered sinomenine to rabbits [J]. Biomed Chromatogr, 2015, 29(6): 883-889.

[18] 李乐,张彩玲,宋必卫. 青藤碱的药理研究与临床应用 [J]. 中药新药与临床药理, 2006, 17(4): 310-313.

[19] SUNG K C, FANG J Y, WANG J J, et al. Transdermal delivery of nalbuphine and its prodrugs by electroporation [J]. Eur J Pharm Sci, 2003, 18(1): 63-70.

[20] PETCHSANGSAI M, ROJANARATA T, OPANASOPIT P, et al. The combination of microneedles with electroporation and sonophoresis to enhance hydrophilic macromolecule skin penetration [J]. Biol Pharm Bull, 2014, 37(8): 1373-1382.

[责任编辑 刘德文]