

不同接受液对药物体外透皮试验的影响

兰颐, 王琼, 安静, 陈岩岩, 王文平, 吴清*

(北京中医药大学中药学院, 北京 100102)

[摘要] 目的: 考察不同接受液对药物体外透皮试验的影响。方法: 以 5-氟尿嘧啶为模型药物, 用生理盐水配制一定浓度牛血清白蛋白(BSA)、苜蓿 98(Brij98)、泊洛沙姆 188、聚山梨酯 80(tween-80)、乙醇、 γ -环糊精及十二烷基硫酸钠溶液(SDS)作透皮试验接受液, 正常操作条件处理大鼠皮肤 12 h 后, 换以生理盐水并加入药物后测定模型药物的透皮吸收参数; 利用扫描电镜观察上述接受液对大鼠皮肤角质层的影响。结果: 3% BSA, 6% Brij98, 低浓度泊洛沙姆 188、tween-80、乙醇、 γ -环糊精对药物透皮吸收参数均无明显影响, 但后四者在高浓度条件下表现出一定影响, 离子型表面活性剂 SDS 对大鼠皮肤影响较为严重。结论: 体外透皮试验接受液可加入 3% BSA, 6% Brij98, 低浓度的泊洛沙姆 188, tween-80, 乙醇及 γ -环糊精以增加药物溶解度, 但浓度不宜过大; 离子型表面活性剂可能对药物透皮吸收有一定影响, 应慎重添加。

[关键词] 接受液; 接受液添加剂; 体外透皮试验; 经皮渗透

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)13-0007-04

[doi] 10.11653/syfy2013130007

Effect of Different Receiving Solution on *in vitro* Drug Transdermal Test

LAN Yi, WANG Qiong, AN Jing, CHEN Yan-yan, WANG Wen-ping, WU Qing*

(School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

[收稿时间] 20121223(014)

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划项目(2012CB724001); 北京中医药大学自主选题项目(2011-JYBZZ-XS049); 北京中医药大学创新团队发展计划资助项目(2011-CXTD-13); 北京市自然科学基金项目(7132127)

[第一作者] 兰颐, 在读博士, 从事中药新剂型与新技术研究, Tel: 010-84738645, E-mail: lanyifly@126.com

[通讯作者] * 吴清, 教授, 博士生导师, 从事中药新剂型与新技术研究, Tel: 010-84738611, E-mail: qwu@vip.sina.com

外透皮吸收的效果, 发现白藜芦醇包合物乳膏的最佳促渗剂为 1% 氮酮。

[参考文献]

- [1] 高守红, 杨少麟, 范国荣. 虎杖的研究进展[J]. 药学实践杂志, 2005, 23(3): 145.
- [2] Goldberg D M, Ng E, Karumanchiri A, et al. Assay of resveratrol glucosides and isomers in wine by direct injection high performance liquid chromatography[J]. J of Chromatogr A, 1995, 708: 89.
- [3] 孙娟. 虎杖中白藜芦醇和挥发油的分离分析研究[D]. 长沙: 中南大学, 2007.
- [4] 梁辉, 邹盛勤. RP-HPLC 同时测定不同根龄虎杖根中虎杖苷和白藜芦醇[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(23): 62.
- [5] 郭丽蓉, 周莉玲. 冰片 β -环糊精、羟丙基- β -环糊精包合物的制备及稳定性[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(8): 7.
- [6] 夏威. 白藜芦醇分子包合物的制备及其性能研究

[D]. 石家庄: 河北农业大学, 2012.

- [7] 周蕾, 陈彦, 张振海, 等. 不同促渗剂对芍药苷透皮吸收的影响[J]. 中华中医药杂志, 2011, 26(9): 2100.
- [8] 张兆旺. 中药药剂学[M]. 2 版. 北京: 中国中医药出版社, 2007: 263.
- [9] 张岭, 严子平, 张莉, 等. 不同透皮吸收促进剂对左旋肉碱透皮特性的影响[J]. 中国新药杂志, 2012, 21(5): 559.
- [10] 方睿, 张海鸣, 王成芳, 等. 不同透皮吸收促进剂对灯盏花素凝胶剂透皮吸收的影响[J]. 中成药, 2012, 34(6): 1174.
- [11] 张超. 氮酮对骨平巴布膏中葛根素体外透皮吸收的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(6): 1.
- [12] 杜茂波, 吴志成, 刘淑芝. 冠心凝胶膏剂的体外释放和透皮吸收评价[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(11): 43.
- [13] 朱纛, 俞迪佳. 蛇床子挥发油羟丙基- β -环糊精包合工艺优选[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(17): 28.

[责任编辑 仝燕]

[Abstract] Objective: To investigate effect of different receiving solution on *in vitro* drug transdermal test. **Method:** 5-fluorouracil (5-FU) was applied as model drug, receiving solutions of a certain concentration of bovine serum albumin (BSA), Brij98, poloxamer188, tween80, ethanol, γ -cyclodextrin and sodium dodecyl sulfate (SDS) for transdermal test were prepared by physiological saline, the excised rat skins were treated with various additives for 12 h, followed by replacing those receiving solution with normal saline and adding saturated 5-FU into the donor cells to evaluate transdermal absorption of the model drug. Meanwhile, scanning electron microscope (SEM) was used to investigate morphology of the rat skins treated with those receiving solutions. **Result:** 3% BSA, 6% Brij98 and poloxamer188, ethanol, tween80 and γ -CD with low concentration had no significant effect on *in vitro* drug transdermal absorption parameters, but they would exert an influence on the rat skins when the concentration of those four additives were high. In addition, ionic surfactant of SDS had an severely impact on the excised rat skins. **Conclusion:** Those additives, 3% BSA, 6% Brij98, the low concentration of tween80, poloxamer188, ethanol and γ -CD could be added to receiving solution in order to increase drug solubility in proper concentration. But ionic surfactant should be cautious to use as additives of receiving solution.

[Key words] receiving solution; additives of receiving solution; *in vitro* transdermal test; percutaneous penetration

体外透皮试验在经皮制剂处方筛选及透皮影响因素考察等方面具有重要意义,选择合理的体外透皮试验条件是准确反映药物透皮吸收特征的前提之一,如皮肤选择、接受液、温度等,其中,不同接受液的选择对体外透皮试验结果影响尤为显著。

常用的接受液如生理盐水^[1-3]、磷酸盐缓冲液可满足水溶性药物的体外透皮试验要求,但对于在水中溶解度较小的药物,上述接受液因无法满足所需漏槽条件,常会加入一定添加剂以增加药物溶解度。目前报道的添加剂种类较多并无统一标准,如牛血清白蛋白(BSA)^[4]、非离子表面活性剂(苜泽98、泊洛沙姆188、聚山梨酯-80等)^[4-6]、乙醇^[7-8]及环糊精^[9]等,并且添加剂的加入在改善药物溶解度的同时是否会改变皮肤自身性质,从而影响试验结果的研究尚不清晰。因此,本实验以5-氟脲嘧啶(5-FU)为模型药物,结合扫描电镜研究分析常用接受液添加剂对体外透皮试验的影响,为水溶性较低药物的体外透皮试验接受液的选择提供实验依据。

1 材料

TK-20B型药物透皮扩散试验仪(上海锴凯科技贸易有限公司),Quanta250型电子扫描电镜(捷克FEI公司),LC-10AD型高效液相色谱仪(日本岛津国际贸易有限公司),BS 110S型电子分析天平(北京赛多利斯公司),CP-7800型剃毛器(科德士电子厂)。

5-氟脲嘧啶对照品(5-FU,中国药品生物制品检定所,批号100187-200602),5-氟脲嘧啶原料药(5-FU,北京偶合科技有限公司,批号120325),牛血清

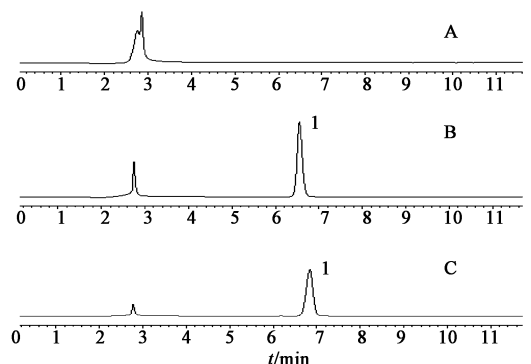
白蛋白(BSA, Sigma公司),聚乙二醇单油醚[Brij98,梯希爱(上海)化成工业发展有限公司],泊洛沙姆188(Poloxamer188,南京威尔化工有限公司),十二烷基硫酸钠(SDS,天津市福晨化学试剂厂),聚山梨酯80(tween-80,天津市光复精细化工研究所),试剂均为分析纯。

雄性SD大鼠,体重(200 ± 20)g,北京维通利华实验动物技术有限公司提供,动物许可证号SCXK(京)2011-0004。

2 方法与结果

2.1 5-FU含量测定

2.1.1 色谱条件 Alltima HP C₁₈AQ色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm, Grace公司),流动相纯水,流速1.0 mL·min⁻¹,检测波长266 nm,柱温30 °C,进样量10 μL,见图1。



A. 空白生理盐水; B. 对照品; C. 透皮样品; 1. 5-FU

图1 5-氟脲嘧啶 HPLC

2.1.2 线性关系考察 精密称取 5-FU 对照品适量,加生理盐水制成质量浓度分别为 0.05, 1, 10, 30, 50, 70, 100 mg·L⁻¹ 的对照品溶液,进行色谱分析。以峰面积为纵坐标,5-FU 质量浓度为横坐标,得回归方程 $Y = 33\ 193.468 X + 1\ 443.325$ ($r = 0.999\ 9$),表明 5-FU 在 0.05 ~ 100 mg·L⁻¹ 与峰面积线性关系良好。

2.1.3 精密性与回收率考察 取低、中、高 3 种质量浓度(0.05, 30, 100 mg·L⁻¹)的 5-FU 对照品溶液($n = 6$),连续测定 3 d。结果 5-FU 日内精密性分别为 1.48%, 0.20%, 0.18%; 日间精密性分别为 1.71%, 0.12%, 0.32%; 相对回收率分别为 101.30%, 100.26%, 99.99%。

2.2 体外透皮吸收试验 取雄性 SD 大鼠处死后,用电动剃毛器剃去大鼠腹部鼠毛,取腹部皮肤,用生理盐水反复冲洗干净,将其置于玻璃板上,仔细剥去皮下脂肪层,立即进行透皮试验。采用改进 Franz 双室渗透扩散装置(扩散面积 1.77 cm²,扩散池容积 7 mL)。将处理好的离体大鼠皮肤置于水平扩散池结合处,角质层面朝向供给池,并用弹簧夹固定。供给池中加入过量 5-FU 供试药液,接受池中加入生理盐水,恒速电磁搅拌(300 r·min⁻¹),扩散池夹层水浴温度保持在(32 ± 0.2) °C。分别在预定的时间(1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 24 h)从接受池取样 1 mL,并随即补充等量的生理盐水,样品液经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,进行含量测定,计算单位面积累积透过量(Q)。

$$Q = V(C_n + \sum_{i=1}^{n-1} C_i)/A$$

式中, C_n 为第 n 个取样点测得的药物质量浓度, C_i 为第 i 个取样点测得的药物质量浓度, A 为扩散池有效渗透面积, V 为扩散池容积。药物稳态透皮速率(J_{ss})为 Q 对 t 作图直线部分的斜率。

2.3 不同接受液添加剂对药物体外透皮吸收的影响 用生理盐水分别配制 3% BSA, 6% Brij98, 10% 和 30% 乙醇, 0.5% 和 1% γ -环糊精(γ -CD), 5% 和 10% 泊洛沙姆 188, 1% 和 5% tween-80, 1% SDS 溶液。分别将上述溶液作为透皮试验接受液,供给池不加药液,在与 2.2 项下操作环境下将离体皮肤置于透皮池间放置 12 h,将上述接受液倒掉并换以生理盐水,此时再向供给池加入饱和 5-FU 溶液,按 2.2 项下方法测定药物的透皮吸收情况。同时,测定对照组(即生理盐水作接受液处理 12 h 后加药测定)及离体大鼠皮肤直接加药测定的药物透皮吸收

情况。各组药物透皮吸收曲线见图 2,计算各组透皮参数(表 1)。

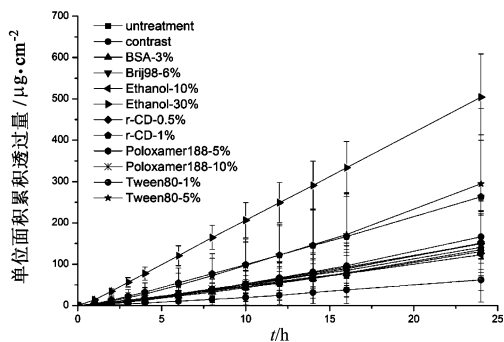


图 2 不同添加剂接受液处理大鼠皮肤后药物的透皮吸收曲线($n = 3$)

表 1 不同添加剂接受液处理大鼠皮肤后模型药物相关透皮吸收参数($n = 3, \bar{x} \pm s$)

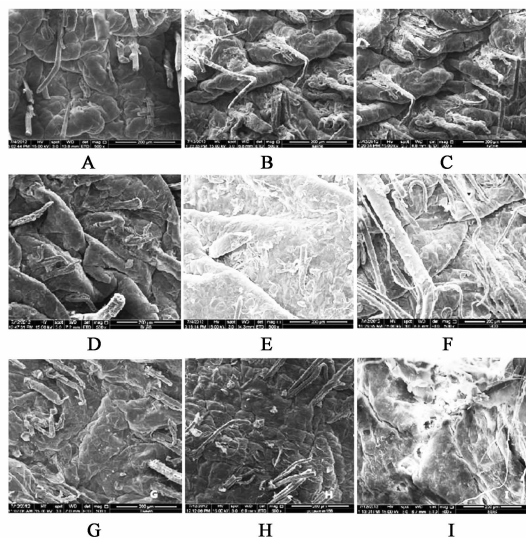
组别	J_{ss} / $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$	T_{lag} /h	Q_t / μg
空白	3.17 ± 1.51	2.69 ± 0.31	238.79 ± 21.94
对照	3.34 ± 0.87	2.63 ± 0.43	293.85 ± 92.56
3% BSA	3.23 ± 1.34	2.78 ± 0.41	231.31 ± 216.24
6% Brij98	3.97 ± 1.49	2.78 ± 0.32	264.45 ± 140.80
10% 乙醇	3.01 ± 1.03	2.41 ± 0.24	217.23 ± 35.72
30% 乙醇	21.09 ± 4.20 ²⁾	1.52 ± 0.16 ²⁾	891.07 ± 184.60 ²⁾
0.5% γ -CD	3.93 ± 1.27	2.30 ± 0.45	265.01 ± 137.59
1% γ -CD	7.24 ± 1.21 ²⁾	1.36 ± 0.17 ²⁾	465.03 ± 264.76 ²⁾
5% 泊洛沙姆 188	3.58 ± 1.49	2.52 ± 0.23	267.04 ± 125.63
10% 泊洛沙姆 188	5.64 ± 0.84 ¹⁾	1.51 ± 0.61 ¹⁾	248.92 ± 29.46
1% tween-80	2.84 ± 1.05	2.81 ± 0.36	131.73 ± 35.89 ²⁾
5% tween-80	7.46 ± 4.02	1.74 ± 0.30 ¹⁾	299.42 ± 159.94
1% SDS	32.53 ± 1.22 ²⁾	0.66 ± 0.11 ²⁾	1026.26 ± 497.02 ²⁾

注:与对照组相比¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ 。

由表 1 和图 2 可知,3% BSA 和 6% Brij98 作接受液对模型药物的透皮吸收无显著影响。10% 乙醇,0.5% γ -CD,5% 泊洛沙姆 188 及 1% tween-80 处理大鼠皮肤一段时间后未对 5-FU 的透皮吸收产生明显影响,但随这 4 种物质浓度的增加,对模型药物的透皮吸收均有不同程度的影响;其中 30% 乙醇处理后,5-FU 的透皮速率与对照组相比增加近 7 倍,滞后时间(T_{lag})显著降低。1% SDS 作接受液处理大鼠皮肤 12 h 后,药物透皮速率增大近 10 倍,且 T_{lag} 显著减小,说明离子型表面活性剂对大鼠皮肤影响较为明显。

2.4 扫描电镜观察 以生理盐水配制不同体外透皮试验接受液,供给池不加药,将离体皮肤按正常的透皮操作处理 12 h 后,取出并用生理盐水清洗干

净,将皮肤剪成适宜大小后,置于 2.5% 戊二醛固定液中进行初固定,用 0.1 mol·L⁻¹ 磷酸缓冲液漂洗 3 次后再用 1% 饿酸进行固定,采用不同体积分数乙醇脱水,CO₂ 临界点干燥,利用离子溅射喷金镀膜,所制样品置于扫描电镜下观察并拍照,见图 3。



A. 空白组;B. 对照组;C. 3% BSA;D. 6% Brij98;
E. 30% 乙醇;F. 1% γ -CD;G. 5% tween-80;
H. 10% 泊洛沙姆 188;I. 1% SDS

图 3 不同添加剂溶液处理大鼠皮肤后皮肤表面的 SEM

由图 3A 可知,正常大鼠皮肤表面呈褶皱状,并有规律排列,纹理较为清晰。由图 3B,C,D 可知,皮肤表面褶皱明显,与空白组相比变化较小,说明生理盐水,3% BSA 和 6% Brij98 并未对皮肤角质层产生明显影响。30% 乙醇使皮肤表面褶皱逐渐不明显,且伴有脱落的鳞片状物(图 3E);1% γ -CD,5% tween-80 和 10% 泊洛沙姆 188 也对皮肤角质层有所影响,皮肤表面变平(图 3F,G,H),说明高体积分数乙醇, γ -CD,tween-80 及泊洛沙姆作接受液对皮肤有一定破坏作用。此外,离子型表面活性剂 SDS 对皮肤的影响较为严重,SDS 可使褶皱消失,并可严重破坏皮肤毛囊,甚至产生孔隙(图 3I),说明在接受液中应慎重加入离子型表面活性剂。

3 讨论

由于 5-FU 在水中溶解度达 12.41 g·L⁻¹^[10],并具良好透皮吸收,选择生理盐水为接受液时能为其透皮吸收提供漏槽条件,从而保证准确反映药物透皮吸收过程,故选择 5-FU 为模型药物。

3% BSA,6% Brij98 是目前研究较多的 2 种接受液,本实验结果说明二者对大鼠的体外透皮试验未

产生明显影响,与文献报道一致。乙醇、tween-80、泊洛沙姆 188 及 γ -CD 在低浓度时也未见明显影响,但当其浓度达一定值后,将改变皮肤正常生理结构,从而影响试验结果,扫描电镜结果很好说明了这点。本实验将大鼠皮肤用不同接受液处置一段时间后,采用体外透皮试验和扫描电镜反映不同添加剂对透皮试验结果及皮肤表面角质层的影响,利用相应透皮参数和形态学观察解释了其影响过程,为其他接受液的筛选提供参考。

[参考文献]

- [1] 林桂涛,盛华刚,张超,等. 复方蟾酥镇痛巴布膏剂体外透皮吸收研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(9):1.
- [2] 刘月环,陆洋,杜守颖,等. 宣痹凝胶贴膏剂有效成分的透皮行为研究[J]. 中国中药杂志,2012,37(19):1202.
- [3] 闫小平,官仕杰,郑蕊,等. 2 种不同基质的伤湿止痛膏的经皮渗透实验研究[J]. 中国中药杂志,2011,36(21):2960.
- [4] Bronaugh R L, Stewart R F. Methods for *in vitro* percutaneous absorption studies III: Hydrophobic compounds[J]. J Pharm Sci,1984,73(9):1255.
- [5] Challapalli P V N, Stinchcomb A L. *In vitro* experiment optimization for measuring tetrahydrocannabinol skin permeation[J]. Int J Pharm,2002,241(2):329.
- [6] Moloney S J. The *in vitro* percutaneous absorption of glycerol trioleate through hairless mouse skin [J]. J Pharm Pharmacol,1988,40(11):819.
- [7] Sclafani J, LIU P, Hansen E, et al. A protocol for the assessment of receiver solution additive-induced skin permeability changes. An example with γ -cyclodextrin [J]. Int J Pharm,1995,124(2):213.
- [8] 高振坤,王兰,王建夺. 姜黄素体外经皮渗透性[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(2):39.
- [9] 王森,朱卫丰,欧水平,等. 促透剂对良肤乳膏中丹皮酚、白鲜碱、桉酮和甘草次酸的体外透皮吸收及皮肤滞留量的影响[J]. 中国中药杂志,2009,34(14):1778.
- [10] Li G F, Kaminyama F, Liu L J, et al. Influence of different layers of skin on the percutaneous absorption of drugs with different lipophilicity [J]. J Med Coll PLA, 2002,17(2):152.

[责任编辑 全燕]