

版(2004年版),以落新妇苷峰和黄杞苷峰做校正,生成对照图谱,对11批样品图谱与对照图谱进行了相似度评价,结果相似度均在0.95以上,且落新妇苷的峰高均明显高于图谱中其它峰。该结果反映11批药材的整体面貌是一致的,说明该指纹谱对于从整体上控制广西地产黄杞叶药材质量具有实际意义。

REFERENCES

- [1] Delectis Florae Reipublicae Popularis Sinicae, Agendae Academica Sinicae Edita. Flora Reipublicae Popularis Sinicae (中国植物志) [M]. Vol 21. Beijing: Science Press, 1979: 11.
- [2] Chinese Herbalism Editorial Board. Chinese Materia Medica (中华本草) [M]. Vol 2. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 1996: 371.
- [3] XU R, WEI S. Study on chemical constituents of *Engelhardtia colebrookinana* Lindl.ex Wall [J]. Guangxi J Tradit Chin Med(广西中医药), 2007, 30(4): 56-57.

- [4] Fujian Institute of Traditional Chinese Medicine. Fujian Medical Records(福建药物志) [M]. Vol 2. Fuzhou: Fujian Science and Technology Press, 1983: 69.
- [5] LI J S, JIANG Z H, MU Y B, et al. The ether constituents from the barks of *Engelhardtia fenzell* Merr [J]. Plant Resour Environ(植物资源与环境), 1993, 2(1): 7-9.
- [6] HE J C, WEI S, LAN S B, et al. Study on chemical constituents from the barks of *Engelhardtia colebrookinana* Lindl.ex Wall [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2006, 37(12): 1788-1789.
- [7] LI X, CHEN G M, WANG M Q. Investigations on the resources and exploiting situation of the substituting for tea plant in China [J]. Sum Rev(综述与述评), 2008, 11(12): 4.
- [8] HUANG H Q, CHENG Z H, SHI H M, et al. Isolation and characterization of two flavonoids, engeletin and astilbin, from the leaves of *Engelhardtia roxburghiana* and their potential anti-inflammatory properties [J]. J Agric Food Chem, 2011, 59(9): 4562-4569.
- [9] ZHANG X, YAO Y, ZENG S, et al. Metabolism of ebracteolata compound B studied *in vitro* with human liver microsomes, HepG2 Cells and recombinant human enzymes [J]. Drug Metab Dispos, 2010, 38(12): 2157-2162.

收稿日期: 2013-05-08

盐酸氨酮戊酸溶液剂与水凝胶的透皮及体内转化效果评价

郭倩倩^{1,2}, 刘金华^{1,2}, 刘二刚², 赵永星¹, 华海婴², 薛逸君³, 黄永焯², 蒋剑平^{3*}, 苏勇^{3*} (1.郑州大学药学院, 郑州 450001; 2.中科院上海药物研究所, 上海 201203; 3.上海复旦张江生物医药有限公司, 上海 201203)

摘要: 目的 考察盐酸氨酮戊酸溶液剂及水凝胶2种制剂的透皮性能及皮内转化效果,为药物的临床应用提供参考。方法 通过体外透皮实验考察盐酸氨酮戊酸的水凝胶和溶液剂的透皮效果,并对2种制剂在活体动物皮肤中的转化产物原卟啉 IX(PpIX)进行定量分析,综合考察2种制剂的潜在治疗效果。结果 体外透皮实验中,溶液剂在乳猪单位面积皮肤中的滞留量为 $(52.68 \pm 9.95) \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$,4 h 累积透过量(Q)为 $(38.83 \pm 15.70) \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$,透皮速率为 $(12.27 \pm 5.99) \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$,透皮时滞(T_1)为 $(0.70 \pm 0.35) \text{h}$;凝胶剂分别为 $(59.90 \pm 28.68) \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$, $(41.91 \pm 18.80) \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$, $(13.22 \pm 5.82) \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ 和 $(0.80 \pm 0.32) \text{h}$;体内实验中,用药4 h 时裸鼠单位质量皮肤中的 PpIX 含量分别为 $(2.14 \pm 0.22) \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ (水凝胶)和 $(2.17 \pm 0.48) \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ (溶液剂)。结论 体内外实验结果表明,2种制剂的透皮效果及动物皮肤内转化生成 PpIX 的能力无显著差异,可根据临床需要选择合适的剂型和给药方案。

关键词: 盐酸氨酮戊酸;透皮吸收;原卟啉 IX

中图分类号: R943

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2014)01-0057-04

Transdermal and Biotransformation Differences between Amindevulinic Acid Hydrochloride Solution and Gel Formula

GUO Qianqian^{1,2}, LIU Jinhua^{1,2}, LIU Ergang², ZHAO Yongxing¹, HUA Haiying², XUE Yijun³, HUANG Yongzhuo², JIANG Jianping^{3*}, SU Yong^{3*} (1.School of Pharmaceutical Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China; 2.Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203, China; 3.Shanghai Fudan-Zhangjiang Bio-pharmaceutical Co.,Ltd., Shanghai 201203, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To assess the transdermal and *in vivo* biotransformation behavior of the topical applied

基金项目:“重大新药创制”国家科技重大专项(2009ZX09401-001, 2012ZX09401001);上海市科研计划项目(13431901900, 11PJ1411800)

作者简介:郭倩倩,女,硕士生 Tel: (021)20231000-1403 E-mail: qian1291@sohu.com *通信作者:蒋剑平,男,工程师 Tel: (021)58953355-1217 E-mail: jjjiang@fd-zj.com 苏勇,男,博士,高级工程师 Tel: (021)58953355-1303 E-mail: ysu@fd-zj.com

aminolevulinic acid hydrochloride(ALA) in the dosage forms of solution and gel. **METHODS** Transdermal behavior of the two formulations was performed in diffusion cell; ALA converted protoporphyrin(PpIX) in mice skin was quantified as an index to assess the transformation efficiency of the two formulations. **RESULTS** The cumulative retained and permeated(Q) amount of ALA in pig skin, transdermal flux and lag time(T_L) of ALA solution were $(52.68 \pm 9.95) \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$, $(38.83 \pm 15.70) \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$, $(12.27 \pm 5.99) \text{mg}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$, and $(0.70 \pm 0.35) \text{h}$, respectively. The results from ALA gel were $(59.90 \pm 28.68) \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$, $(41.91 \pm 18.80) \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$, $(13.22 \pm 5.82) \text{mg}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ and $(0.80 \pm 0.32) \text{h}$, respectively. PpIX converted from ALA was measured to be $(2.14 \pm 0.22) \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ for gel and $(2.17 \pm 0.48) \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ for solution. **CONCLUSION** There are no statistically differences between ALA gel and solution both in transdermal behavior and PpIX transformation efficiency, based on *in vitro* and *in vivo* experiments. Considerations should be given to formulation differences when clinical decisions being made.

KEY WORDS: aminolevulinic acid hydrochloride; transdermal absorption; protoporphyrin

5'-氨基酮戊酸(ALA)介导的光动力治疗借助于 ALA 在体内转化生成的光敏性物质原卟啉 IX(PpIX)在光辐射条件下产生的杀伤作用发挥治疗效果^[1]。由于皮肤易于接受光照射,光动力疗法近年来在皮肤类疾病诸如皮肤癌变^[2]、光化性角化病^[3]、痤疮^[4]、尖锐湿疣^[5]等疾病的治疗方面得到了广泛应用,其最主要靶点可能为线粒体^[6]。皮肤的角质层是影响药物的吸收转化的主要障碍。通过制剂手段促进药物的经皮吸收是目前克服角质层屏障的主要手段^[7]。

ALA 在应用中有贴剂^[8]、凝胶剂^[9]、膏剂^[10]及溶液剂^[11]。不同剂型各有其适用范围和优劣。本实验选择了 2 种盐酸氨酮戊酸外用制剂(溶液剂和凝胶剂),研究 2 种剂型的经皮吸收过程和体内生物转化情况。为药物进一步的临床应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 试剂与材料

1.1.1 试剂 ALA 对照品(上海复旦张江生物医药股份有限公司,批号:101101,纯度>99%); PpIX 对照品(上海复旦张江生物医药股份有限公司,批号:MKBJ2588V,纯度>90%); 盐酸氨酮戊酸溶液剂(上海复旦张江生物医药股份有限公司,批号:101101,规格:118 mg); 盐酸氨酮戊酸水凝胶(上海复旦张江生物医药股份有限公司,批号:20100511,规格:500 mg); 甲醇(德国 Merk,色谱纯); 乙腈(德国 Merk,色谱纯); 三氟乙酸(国药集团化学试剂有限公司,分析纯); 荧光胺(美国 Sigma-Aldrich); 丙酮(国药集团化学试剂有限公司,分析纯); 超纯水(PWVF, Heal Force, Hong Kong)。

1.1.2 仪器 TK-12B 型透皮扩散试验仪(上海铂凯科技贸易有限公司); Agilent-1260 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); Spursil C₁₈ 柱(迪马科技有限公司,中国); F4600 荧光分光光度计(日本日立)。

1.1.3 生物材料 透皮实验所用皮肤为 10 d 龄乳猪(体质量约 1.5 kg, 购自杭州文兴养殖场)皮肤; 体内实验所用动物为 BALB/c-null 裸鼠(18~22 g, 上海斯莱克实验动物有限公司), ♂, 实验动物合格证号: 2007000533797。

1.2 ALA 及 PpIX 的含量测定方法

1.2.1 样品处理方法 皮肤样品经天平精密称重后,按皮肤-提取液(0.1 g:10 mL)的比例加入 90% 甲醇。用分散机匀浆后 10 000 r·min⁻¹ 离心 15 min,取上清测定待测成分含量。

透皮接收液样品的处理:取接收液 200 μL,加入 600 μL 乙腈,涡旋 1 min,10 000 r·min⁻¹ 离心 10 min。取上清测定待测成分含量。

1.2.2 ALA 的测定 采用柱前衍生 HPLC 测定样品中 ALA 的含量。衍生方法:取待测样品 200 μL,加入 0.1 mol·L⁻¹ 硼酸盐缓冲液(pH 7.4)600 μL,荧光胺丙酮溶液(1.04 mg·mL⁻¹)200 μL,混匀,室温下避光静置 10 min,用 0.45 μm 的微孔滤膜过滤后进样。

色谱条件: Spursil C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相: 水(0.1%TFA)-乙腈(0.1%TFA)=60:40; 流速: 1 mL·min⁻¹, 检测波长: 383 nm; 进样量: 10 μL; 检测时间: 12 min。

1.2.3 PpIX 的测定 采用荧光分光光度法测定组织中 PpIX 的含量。PpIX 的荧光检测条件为:激发波长: 398 nm, 发射波长: 632 nm; 激发栅栏宽: 5 nm, 发射栅栏宽 5 nm; PMT 电压为: 650 V。

1.3 ALA 经皮吸收性能的考察

将新生猪皮夹于透皮扩散池与接受池之间,以 pH 7.4 的 PBS 作为接收液。将接收池置于 32 °C 恒温水浴中,调节磁力搅拌子转速为 200 r·min⁻¹。分别取 ALA 溶液剂与凝胶剂 0.5 mL 于供应池,给药后 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0 h 分别从接收池取样 0.5 mL,同时补充等体积的的 PBS 溶液(pH

7.4), 每个时间点平行测定 6 个样品。接收液及皮肤中 ALA 的测定方法按“1.2.2”项下方法制备样品及 HPLC 色谱条件。根据扩散池内径, 算得透皮面积为 0.785 cm^2 , 根据测定的 ALA 的浓度以及透皮面积, 计算单位面积累积渗透量 Q 、渗透速率、皮肤内滞留时间 T_L 以及单位面积皮肤中 ALA 的含量。

1.4 PpIX 生成量的考察

1.4.1 药液的配制 取 2 种制剂, 分别按包装上 ALA 标示含量加入蒸馏水并摇匀, 使之成为含 ALA 浓度为 20% 的药液。

1.4.2 动物实验 取裸鼠 12 只, 随即分成 2 组, 每组 6 只, 编号并称重。在其背部标记直径 1 cm 的区域用于给药。取上述配制好的溶液各 0.5 mL, 用棉签在给药区域涂抹给药, 直至 0.5 mL 溶液全部给完, 期间保持给药部位湿润, 并在给药结束后用 3M 胶带将棉签固定在给药区域, 从给药初始计时至 4 h 时将裸鼠断颈处死, 取给药区域皮肤, 并用超纯水将其洗净。吸干皮肤表面水分, 称重, 按照“1.2.3”项下方法测定样品中 PpIX 含量。

1.5 统计分析

数据分析采用 SPSS 17.0 进行处理, 显著性比较采用单因素方差分析。

2 结果与讨论

2.1 ALA 的 HPLC 方法学考察

2.1.1 专属性 ALA 衍生后在皮肤接收液及皮肤中的色谱图见图 1。由图 1 可知, 无论在接收液中还是在皮肤中, ALA 衍生后其色谱图均得到了很好的分离, 分离度达到 2.13, 理论板数为 16 042。

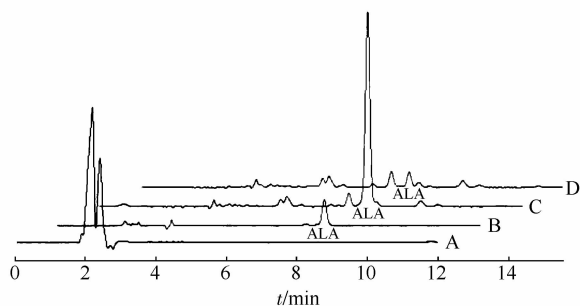


图 1 HPLC 色谱图

A-空白溶剂; B-ALA; C-透皮接收液; D-鼠皮提取液

Fig 1 HPLC Chromatograms

A-blank; B-ALA; C-transdermal permeates; D-mice skin extracts

2.1.2 标准曲线 配制一系列浓度的 ALA 对照品溶液, 按“1.2”项下方法进行处理, 使其浓度分

别为 0.5, 1, 2, 5, 8, 10, 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 按“1.2.2”项下色谱条件分析, 以峰面积为纵坐标, 以标准溶液的浓度为横坐标, 绘制标准曲线。得到 $Y=20.46X+2.519$, $r=0.999$, 线性范围为 0.5~20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。方法的定量限为 120 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($n=6$, $\text{RSD}<20\%$)。

2.1.3 精密度考察 配制浓度为 0.5, 5, 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 ALA 的溶液, 按照“1.2.2”项下方法测定其浓度 ($n=5$), 计算其日内精密度; 连续测定 5 d, 计算其日间精密度。结果表 1。

表 1 日内和日间精密度

Tab 1 Inner- and intra-day precision

| ALA 浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ | 日内精密度 | | 日间精密度 | |
|---------------------------------------------|-------------------------------------------|-----------|-------------------------------------------|-----------|
| | 检测浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ | RSD/ % | 检测浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ | RSD/ % |
| 0.5 | 0.53 | 10.83 | 0.55 | 4.62 |
| 5 | 4.96 | 1.84 | 4.94 | 1.48 |
| 20 | 19.90 | 0.71 | 19.6 | 0.89 |

2.1.4 回收率 以猪皮提取液配制浓度为 0.5, 5, 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 ALA 溶液, 按“1.2”项下方法处理样品并计算 ALA 浓度 C_1 ; 另用 90% 甲醇代替猪皮提取液配制 ALA 标液并计算样品理论值 C_0 。以 $C_1/C_0 \times 100\%$ 计算样品回收率。结果 3 个浓度的回收率分别为 $(103.98 \pm 7.22)\%$, $(98.16 \pm 2.34)\%$, $(97.76 \pm 0.69)\%$ 。

2.2 PpIX 的含量测定

配制一系列浓度的 PpIX 对照品溶液。按照“1.2.3”项下方法测定荧光强度。以荧光值对溶液浓度作标准曲线为: $Y=1.387X+12.62$, $r=0.999$, 线性范围为: 10~200 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.3 ALA 经皮吸收性能的考察

2 种制剂在给药后 0.5~4 h 的累积透过量随时间变化曲线见图 2。由于 0.5 h 时间点的取样样品 ALA 含量太低, 处于标准曲线线性范围外, 所以设定 0.5 h 时 ALA 含量为 0。由图可见, 当透皮达到稳态后, 各制剂的累积透皮-时间曲线呈近直线态。取透皮达稳态的直线段进行线性拟合, 直线斜率为该制剂的透皮速率 ($\text{Flux}/\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$); 直线与时间轴的交点为该制剂的透皮时滞 (T_L/h), 结果见表 2。结果显示: 盐酸氨酮戊酸 2 种制剂的透皮时滞及透皮速率均无显著性差异 ($P>0.05$)。在 4 h 时, 盐酸氨酮戊酸水凝胶具有较高的单位面积累积渗透量。与溶液剂相比, 凝胶有更高的储药量

和表面滞留能力^[12], 但体内实验中 2 种制剂在单位质量皮肤中的 PpIX 生成量无显著差异 $[(2.17 \pm 0.48) \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \text{ vs } (2.14 \pm 0.22) \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}]$ 。由于皮肤中 PpIX 主要从局部 ALA 转化而来, 2 种制剂 PpIX 的无差别可能源于皮肤有限的 ALA 转化能力。考虑到本次实验中采用连续多次给药的方式, 当采用单次给药的情况下, 由于凝胶剂具有更好的皮肤滞留能力, 预期会有更高的 PpIX 转化效率。

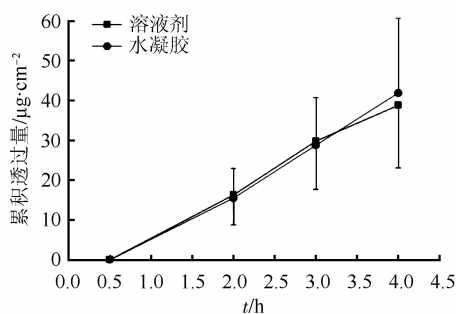


图 2 2 种制剂在新生家猪皮肤上单位面积累积渗透量-时间曲线

Fig 2 Cumulative permeated amount versus time profiles of ALA gel and solution

表 2 ALA 制剂的透皮速率、透皮时滞、皮肤中 ALA 滞留量和体内实验 PpIX 生成量(n=6)

Tab 2 Transdermal flux, lag time, cumulative retained amount of ALA and *in vivo* transformed PpIX(at 4 h) of the two topical applied ALA formulations

| 制剂 | 体外透皮参数及皮内 PpIX 生成量 | | | |
|-----|----------------------------------------------------------------|-----------------------|---------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|
| | 体外透皮速率/ $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ | 体外透皮时滞 T_L/h | 单位面积皮肤 ALA 含量/ $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ | 透皮 4 h 后单位质量皮肤 PpIX 生成量/ $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ |
| 溶液剂 | 12.27±5.99 | 0.70±0.35 | 52.68±9.95 | 2.17±0.48 |
| 水凝胶 | 13.22±5.82 | 0.80±0.32 | 59.90±28.68 | 2.14±0.22 |

3 讨论

本实验建立了一种新的利用高效液相色谱检测盐酸氨酮戊酸的方法。此方法准确性高, 定量限低, 专属性好。通过体外透皮实验, 发现盐酸氨酮戊酸溶液剂和凝胶剂 2 种制剂的体外透皮效果无显著性差异; 裸鼠的在体实验表明 2 种制剂的在体透皮实验亦无显著性差异。但如果采用单次给药方式, 凝胶剂可能会有比溶液剂更高的累积透过量 and 皮内 PpIX 转化效率。提示临床用药时应根据临床需要选择合适的剂型以达到良好的治疗效果。本实验为盐酸氨酮戊酸凝胶的皮肤给药的可行性提供了一定的依据, 为以后盐酸氨酮戊

酸其他制剂的透皮实验提供了一定的理论基础。

REFERENCES

- [1] MARCUS S L, SOBEL R S, GOLUB A L, et al. Photodynamic therapy (PDT) and photodiagnosis (PD) using endogenous photosensitization induced by 5-aminolevulinic acid (ALA): current clinical and development status [J]. J Clin Laser Med Surg, 1996, 14(2): 59-66.
- [2] MAYTIN E, ANAND S, ORTEL B, et al. Combination therapy using methotrexate, 5-fluorouracil, and vitamin D as PpIX-elevating agents followed by ALA-PDT of skin tumors: Mechanisms of action [J]. Photodiagn Photodynamic Ther, 2011, 8(2): 129-129.
- [3] MARTIN G. Prospective, case-based assessment of sequential therapy with topical Fluorouracil cream 0.5% and ALA-PDT for the treatment of actinic keratosis [J]. J Drugs Dermatol, 2011, 10(4): 372-378.
- [4] GOLD M H, BRADSHAW V L, BORING M M, et al. The use of a novel intense pulsed light and heat source and ALA-PDT in the treatment of moderate to severe inflammatory acne vulgaris [J]. J Drugs Dermatol, 2004, 3(6 Suppl): S15-19.
- [5] LI J, YI Y, ZHU W. Three stages of 5-aminolevulinic acid-photodynamic therapy for condyloa acuminatum of external urethral meatus [J]. J Cent South Univ(Med Sci)(中南大学学报: 医学版), 2011, 36 (11): 1115-1119.
- [6] ZHANG D D, LI W N, MEI W J, et al. Studies on the target of photodynamic therapy with porphyrin derivatives as photosensitizer [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2013, 30(4): 445-449.
- [7] ÖZGÜNEY I S, KARASULU H Y, KANTARCI G, et al. Transdermal delivery of diclofenac sodium through rat skin from various formulations[J]. AAPS PharmSciTech 2006, 7(4): E39-E45.
- [8] SZEIMIES R M, STOCKFLETH E, POPP G, et al. Long-term follow-up of photodynamic therapy with a self-adhesive 5-aminolaevulinic acid patch: 12 months data [J]. Br J Dermatol, 2010, 162 (2): 410-414.
- [9] YANG D F, TSENG M K, LIU C J, et al. Comparison of light dose on topical ALA-mediated photodynamic therapy for DMBA-induced hamster buccal pouch premalignant lesions [J/OL]. Proc. SPIE 8224, Biophotonics and Immune Responses VII, 82240R (February 9, 2012). Doi:10.1117/12.907542.http://dx.doi.org/10.1117/12.907542.
- [10] DING H L, WANG X L, WANG H W, et al. Successful treatment of refractory facial acne using repeat short-cycle ALA-PDT: Case study [J]. Photodiagn Photodynamic Therapy 2011, 8 (4): 343-346.
- [11] SCHMIEDER G, HUANG E, JARRATT M. A multicenter, randomized, vehicle-controlled phase 2 study of blue light photodynamic therapy with aminolevulinic acid HCl 20% topical solution for the treatment of actinic keratoses on the upper extremities: The effect of occlusion during the drug incubation period [J]. J Drugs dermatol, 2012, 11(12): 1483-1489.
- [12] KANTARIA S, REES G D, LAWRENCE M J. Gelatin-stabilised microemulsion-based organogels: rheology and application in iontophoretic transdermal drug delivery [J]. J Control Release, 1999, 60(2): 355-365.

收稿日期: 2013-04-07