

月桂氮革酮及电穿孔技术对萘普生经皮渗透的影响

胡巧红 梁文权* 包家立¹ 平其能² (杭州 310031 浙江大学湖滨校区药学院药剂教研室;¹杭州 310031 浙江大学临床医学研究所;²南京 210009 中国药科大学药学院)

摘要 目的:研究月桂氮革酮及电穿孔技术对萘普生经皮渗透的影响。方法:应用双室扩散池方法研究促渗剂月桂氮革酮及电穿孔技术对萘普生在离体大鼠腹部皮肤经皮渗透的影响。结果:电穿孔(指数衰减型脉冲,脉冲幅度为380V,电容器电容为22 μ F,脉冲率为4pulses \cdot min⁻¹,脉冲宽度 $\tau \approx 5.5$ ms,脉冲数100个),月桂氮革酮预处理皮肤或两者合用均可显著促进萘普生的渗透速率和累积渗透量。两者合用的渗透速率与电穿孔或月桂氮革酮预处理的渗透速率无显著差异。结论:月桂氮革酮预处理及电穿孔技术均能明显促进萘普生的经皮渗透,两者合用并无协同作用。

关键词 电穿孔;经皮渗透;萘普生;月桂氮革酮

TRANSDERMAL TRANSPORT OF NAPROXEN BY ELECTROPORATION AND AZONE

Hu Qiaohong(Hu QH), Liang Wenquan(Liang WQ),¹Bao Jiali(Bao JL),²Ping Qineng(Ping QN) (Department of Pharmaceutics, College of Pharmaceutical Science, Zhejiang University, Hangzhou 310031; ¹Clinical Medical Institute, Zhejiang University, Hangzhou 310031; ²School of Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009)

ABSTRACT OBJECTIVE:To study the effect of electroporation, azone or both on the transdermal transport of naproxen through skin *in vitro*. **METHOD:**Use side-by-side diffusion cell method to study the *in vitro* transdermal transport of naproxen achieved with electroporation, azone or both. **RESULTS:**The cumulative quantity and flux of naproxen were obviously increased by electroporation (exponentially decaying pulse, voltage = 380 V, pulse time = 5.5 ms, capacity = 22 μ F, pulse number = 100, pulse frequency = 4pulses \cdot min⁻¹), azone or both. There was no obvious difference between the flux achieved with both and that with electroporation or azone. **CONCLUSION:**Electroporation and azone can significantly increase the transdermal transport of naproxen through skin *in vitro*, respectively. But they have not synergetic effect.

KEY WORDS electroporation, transdermal transport, naproxen, azone

促进药物经皮渗透的方法有多种,化学方法可使用促渗剂,物理方法有超声波处理、离子导入和电穿孔技术等。电穿孔技术最先被用于细胞生物学中的DNA导入等^[1]。近十年来,应用电穿孔技术促进药物经皮渗透的研究报道已有不少。电穿孔是应用瞬间高压脉冲电场使脂质双分子层产生暂时性的水性通道,膜的通透性增加。药物可快速通过这些水性通道,从而缩短经皮渗透的时滞,使药物迅速达到较高的浓度并在较长的时间内维持该浓度。此外可通过改变电穿孔的电学参数值使药物以预期的速率透过皮肤。有不同的模型用于解释电穿孔促进药物经皮渗透的机理,Chizmadzhev等^[2]建立的第一种模型称为脂质途径模型,认为角质细胞无渗透性,外加电场时角质细胞间的脂质区域中形成亲水性孔道,从而促进药物透过。另一种模型称为直线通道(或脂质-角质细胞)模型,认为角质层的亲水性部分由离子储库组成,外加电场时,由于在脂质双层膜中形成孔而使这些离子储库相互连通,这种在储库中的转运比脂质途径的电迁移过程快。近来已将该技术应用于电化疗中治疗浅表性

肿瘤^[3]。另有研究证明可促进芬太尼^[4,5]、环孢菌素A^[3]等的经皮渗透。化学促渗剂用于药物经皮渗透的报道已很多,其中最常用的是月桂氮革酮,它具有促渗作用好、毒副作用小的优点。但至今未见有月桂氮革酮与电穿孔对药物经皮渗透影响的比较的报道。本文用OX4-3型经皮给药电穿孔仪^[6]研究了常用促渗剂月桂氮革酮、电穿孔技术及两者合用对萘普生(naproxen, Mr = 230.26)经皮渗透的影响。

1 药品与仪器

萘普生(西南制药二厂);磷酸二氢钾(浙江湖州化学试剂厂);氢氧化钠(江苏武进县化学试剂厂);甲醇(HPLC级)(浙江临海市有机化工二厂);柠檬酸(江苏宜兴市宜湖助剂厂);柠檬酸钠(浙江萧山化学试剂厂);CS501型超级恒温水浴(重庆试验设备厂);78-1型磁力搅拌器(杭州仪表电机厂);双室扩散池(有效扩散面积 $A_e = 0.5$ cm²,容积V = 4.0ml);OX4-3型经皮给药电穿孔仪(指数衰减型脉冲,最大脉冲幅度可达400V,脉冲率分为1、2、4、8、10、20pulses \cdot min⁻¹六档,电容器电容分为2.2 μ F、22 μ F、68 μ F、100 μ F四档,脉冲

基金项目:国家自然科学基金项目(39670857)

* Tel:(0571)87217205

数范围 1 - 999 个)(浙江医科大学生物医学工程研究所);高效液相色谱仪(美国 Waters 公司:515 型泵,486 紫外 - 可见光检测器);色谱柱:5.0 × 150 mm,内装 Hypersil ODS2 5μm 键合相。

2 方法

2.1 萘普生含量测定

2.1.1 方法

HPLC 法,参考文献^[7]方法,用外标法进行萘普生的含量测定。

测定条件:

流动相:甲醇 - 0.01 mol/L 柠檬酸盐缓冲液 (pH 6.6)

(50:50) (V/V);

流速:1 ml·min⁻¹;检测波长 λ=254nm;进样 20μl,衰减 4。

皮肤浸出液图谱见图 1,月桂氮革酮预处理皮肤浸出液图谱见图 2,萘普生的图谱见图 3。萘普生的保留时间为 7.81 min。

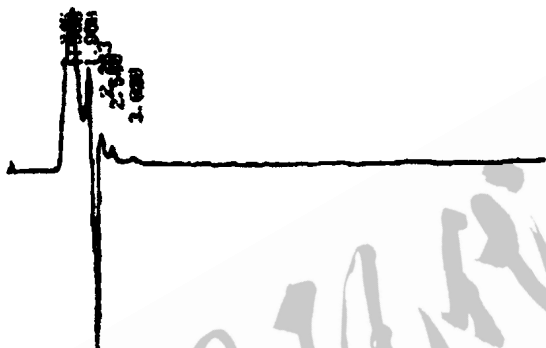


图 1 皮肤浸出液的 HPLC 图谱



图 2 月桂氮革酮预处理皮肤浸出液的 HPLC 图谱

2.1.2 萘普生的标准曲线

精密称取萘普生 0.0192g,置 100 ml 量瓶中,加 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液溶解,再加至刻度,摇匀(浓度为 192μg·ml⁻¹)。再以此溶液稀释,分别得浓度为 0.0768、0.154、0.230、0.384、0.768、3.84、19.2、48.0、96.0、192 μg·ml⁻¹ 的溶液。分别取 20μl 进样(每个浓度进 3 针),以峰面积 A 对浓度 C(μg·ml⁻¹) 回归得标准曲线为:

$$A = 2.07 \times 10^4 \cdot C - 2.45 \times 10^3 \quad (r = 0.9999)$$

2.1.3 接受液中萘普生含量测定

取接受液 20μl 进样,按上述方法测定萘普生含量。

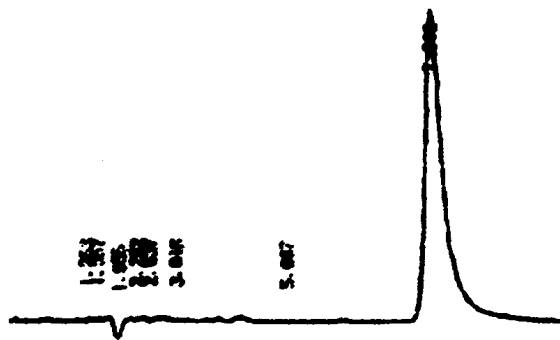


图 3 萘普生的 HPLC 图谱(月桂氮革酮预处理)

2.2 经皮渗透实验

2.2.1 皮肤的制备

取体重约 200g 的雄性 SD 大鼠,用乙醚麻醉,剪净腹部毛,然后涂上月桂氮革酮,待其自然苏醒后正常饲养,14h 后处死,剥离该处皮肤,去除皮下组织,用 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液浸洗 1h 备用。或直接取大鼠断颈处死,剪净腹部毛,剥离该处皮肤,去除皮下组织,用 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液浸洗 1h 备用。

2.2.2 经皮渗透实验

将上述皮肤夹于双室扩散池中,角质层面向供应室,真皮层面向接受室。扩散池固定在磁力搅拌器上以磁力搅拌,保持恒温 32 ± 0.5 °C。供应室中加入萘普生的 pH 7.4 磷酸盐缓冲液的过饱和溶液作为供应液,接受室中加入 pH 7.4 磷酸盐缓冲液作为接受介质。供应室中插入 Ag 电极为负极,接受室中插入 Ag/AgCl 电极为正极,分别进行被动扩散、电穿孔(指数衰减型脉冲,脉冲幅度为 380V,脉冲率为 4 pulses·min⁻¹,电容器电容为 22μF,脉冲宽度 τ ≈ 5.5 ms,脉冲数 100 个)。月桂氮革酮预处理或月桂氮革酮预处理与电穿孔合用的经皮渗透实验。定时取出全部接受液,补加等量接受介质。各时间点取出的接受液用 HPLC 法测定其中萘普生浓度(C),再根据扩散池容积(V)及有效扩散面积 A_e,计算各时间点的累积渗透量 M($M = \frac{\Sigma CV}{A_e}$),从而求得渗透速率 J (J = ΔM / Δt)。

3 结果

3.1 电穿孔(指数衰减型脉冲,脉冲幅度为 380V,脉冲率为 4 pulses·min⁻¹,电容器电容为 22μF,脉冲宽度 τ ≈ 5.5 ms,脉冲数 100 个)。月桂氮革酮预处理或月桂氮革酮预处理与电穿孔合用均可显著地促进萘普生的经皮渗透。由表 1 可知,与被动扩散相比,0.5h 时,电穿孔、月桂氮革酮预处理、两者合用分别使萘普生的累积经皮渗透量增加 34.34 倍、100.62 倍、207.51 倍;12h 时,分别增加 57.22 倍、74.23 倍、85 倍。由表 2 可知,与被动扩散相比,0.25h 时,电穿孔、月桂氮革酮预处理、两者合用分别使萘普生的经皮渗透速率增加 34.34 倍、100.62 倍、207.51 倍。

3.2 由表 2 可知,电穿孔的经皮渗透速率与两者合用的经皮渗透速率无显著差异(P > 0.05, t 检验, n = 4)(J_{e,0.25} = 180.63 ± 41.60 μg·cm⁻²·h⁻¹, J_{e+a,0.25} = 1091.48 ± 739.12 μg·

$\text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$);月桂氮草酮预处理的经皮渗透速率与两者合用的经皮渗透速率也无显著差异($P > 0.05$, t 检验, $n = 4$)

($J_{a,0.25} = 529.22 \pm 147.48 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$, $J_{c+a,0.25} = 1091.48 \pm 739.12 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$)。

表1 萘普生的累积经皮渗透量 ($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$) ($n = 4$)

时间	被动	电穿孔	月桂氮草酮预处理	月桂氮草酮预处理 + 电穿孔
0.5	2.63 ± 0.96	90.31 ± 20.80	264.62 ± 73.74	545.74 ± 369.56
2	14.14 ± 7.39	981.13 ± 402.59	1139.68 ± 238.14	1377.72 ± 715.69
4	30.30 ± 12.36	1819.56 ± 760.49	1994.63 ± 599.81	3680.94 ± 1589.20
6	47.99 ± 15.88	2878.03 ± 955.46	2905.41 ± 920.58	5263.89 ± 1385.05
8	62.40 ± 17.79	3885.93 ± 1214.00	4086.08 ± 1128.03	6119.80 ± 1424.29
10	76.57 ± 23.18	4758.06 ± 1569.25	5613.34 ± 1341.95	7040.47 ± 1415.58
12	96.61 ± 27.21	5527.60 ± 2112.93	7171.21 ± 1935.56	8211.87 ± 1350.08

表2 萘普生的经皮渗透速率 ($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$) ($n = 4$)

时间	被动	电穿孔	月桂氮草酮预处理	月桂氮草酮预处理 + 电穿孔
0.25	5.26 ± 1.92	180.63 ± 41.60	529.22 ± 147.48	1091.48 ± 739.12
1.25	7.68 ± 4.30	593.87 ± 257.35	583.38 ± 138.04	554.65 ± 272.97
3	8.08 ± 2.62	419.22 ± 189.51	427.48 ± 187.47	1115.61 ± 606.64
5	8.85 ± 2.53	529.24 ± 285.28	455.39 ± 239.24	791.47 ± 381.45
7	7.20 ± 1.35	503.95 ± 182.58	590.34 ± 157.40	427.96 ± 30.69
9	7.09 ± 2.90	436.06 ± 205.71	763.63 ± 263.60	460.32 ± 114.94
11	10.01 ± 2.70	384.77 ± 275.45	778.94 ± 582.63	585.7 ± 71.69

4 讨论

4.1 月桂氮草酮的促渗机理是它可与皮肤角质层的类脂双分子层作用,改变其致密性,增加脂质流动性,降低相变温度,从而改善角质层的通透性。电穿孔的促渗机理与此不同。

4.2 月桂氮草酮是较理想的经皮渗透促进剂,但发挥促渗作用较慢,存在时滞,因此我们采用月桂氮草酮预处理皮肤的方法,可消除时滞的影响。电穿孔却不存在预处理过程,并且同样有很好的促渗效果,因此是一种非常方便的方法。

4.3 月桂氮草酮与电穿孔技术合用不能增强各自单用时的促渗作用,这是因为它们各自具有非常强的促渗作用,合用后并不能产生协同作用。

参考文献

1 Weaver JC. Electroporation: a general phenomenon for manipulating cell and tissues. *J Cell Biochem*, 1993, 51: 426.

2 Chizmadzhev YA, Zarnitsin VG, Weaver JC, *et al.* Mechanism of electroinduced ionic species transport through a multilamellar lipid system. *Biophys J*, 1995, 68: 749.

3 Wang S, Kara M, Krishnan TR. Transdermal delivery of cyclosporin A using electroporation. *J Controlled Release*, 1998, 50: 61.

4 Vanbever R, More ND, Preat V. Transdermal delivery of fentanyl by electroporation II. mechanisms involved in drug transport. *Pharm Res*, 1996, 13: 1360.

5 Vanbever R, Langers G, Montmayeur S, *et al.* Transdermal delivery of fentanyl: rapid onset of analgesia using skin electroporation. *J Controlled Release*, 1998, 50: 225.

6 包家立, 梁文权, 胡巧红等. 经皮给药电穿孔仪的研制. 仪器仪表学报, 2000, 21: 66.

7 李端, 刘德林, 朱明等. 用高效液相色谱法测定萘普生片和萘普生钠片的生物利用度. 上海医科大学学报, 1990, 17: 216.