

# 药物经皮转运通道的网络热力学模型

包家立<sup>1,2</sup>, 杨媛媛<sup>1</sup>, 王红<sup>2,3</sup>, 葛霖光<sup>2</sup>, 王会平<sup>1</sup>

(1. 浙江大学医学院, 杭州 310006; 2. 浙江大学生命科学学院, 杭州 310027; 3. 杭州华大基因研发中心, 杭州 310008)

**摘要:** 阐述药物在经皮转运过程中皮肤通道导纳特性, 为经皮给药技术提供理论和方法。用药物经皮转运通道的网络热力学模型建立药物浓度与渗透通量的定量关系, 提出皮肤通道导纳由激活因子和失活因子控制的理论。以替硝唑为模式药物, 进行被动扩散(对照组)和电脉冲增强扩散(实验组)的离体漏槽实验, 结果显示皮肤通道导纳的理论线与实验值拟合较好。理论线计算的激活因子初值  $m_0$ 、激活因子时间常数  $\tau_m$ 、失活因子初值  $h_0$ 、失活因子时间常数  $\tau_h$  对分析皮肤通道特性有重要价值。

**关键词:** 经皮给药; 通道导纳; 网络热力学模型

**中图分类号:** R943.43

## 1 引言

经皮给药电穿孔技术是将高压脉冲施加到皮肤上, 使皮肤出现新的可逆瞬时亲水性通道, 增加分子通过皮肤的能力<sup>[1]</sup>, 它对促进大分子药物经皮渗透具有潜在的应用价值。在这个技术中, 分子的经皮转运途径是促进药物分子经皮渗透的重要因素, 也是经皮给药电穿孔技术研究的重要问题之一。Weaver 等<sup>[2]</sup>提出高压脉冲可以使角质层脂质双层产生新的水性通道的假设。Chizmadzhev 等<sup>[3]</sup>认为药物分子可以通过角质层脂质域或皮肤附属器等已存在的通道进行转运, 也可以通过在高压脉冲电场作用下角质层新产生的可逆瞬时亲水性通道进行转运, 并建立多层脂质系统的弯曲模型和直线模型。Chizmadzhev 等<sup>[4]</sup>建立了皮肤附属器通道模型来定量描述物质经皮渗透通量。局部转运区 (LTRs) 是在脉冲作用后角质层产生了结构性变化的区域 (Zewert 等)<sup>[5]</sup>, 已经用荧光显微镜观察到其变化 (Pliquett 等)<sup>[6,7]</sup>。LTRs 现象的主要解释是电穿孔首先产生水性电孔道, 然后, 局部阻抗发热, 产生了离子和分子转运区的持续变化<sup>[8]</sup>。Martin 等<sup>[9]</sup>用物质转运模型、电路模型和热转换模型描述了 LTRs。Pawlowski 等<sup>[10]</sup>用角质层渗透电流变学模型, 对脉冲电场诱致角质层电特性变化进行了理论分析。

本文以扩散池系统为对象、表皮为药物渗透阻碍层、替硝唑为模式药物, 研究在高压脉冲电场作用下皮肤通道导纳对药物经皮转运的影响, 以此阐述药物经皮渗透的特性。

## 2 药物经皮转运的网络热力学模型

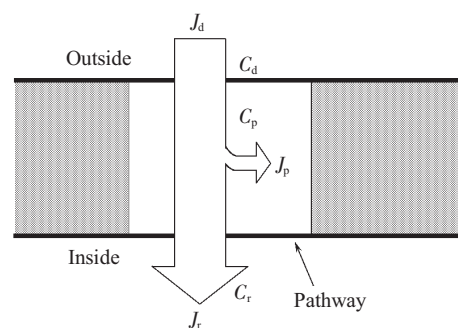
药物经皮转运的途径是皮肤上存在的亲水性通道, 如图 1 所示。设皮肤外侧单位容积药物  $m_d$  通过通道转运到皮肤内侧包含了皮肤内侧单位容积药物  $m_r$  和留存在通道内单位容积药物  $m_p$  两部分, 并且有:

$$m_d = m_r + m_p \quad (1)$$

对(1)式单位容积下药物的溶液浓度有:

$$c_d = c_r + c_p \quad (2)$$

其中:  $c_d$  为皮肤外侧药物的溶液浓度,  $c_r$  为皮肤内侧药物的溶液浓度,  $c_p$  为通道内药物的溶液浓度。



**Fig.1** Schematic diagram of drug transport through pathway in skin.  $J_d$ : Drug flux from outside to pathway of epidermis;  $J_r$ : Drug flux from pathway to inside of epidermis;  $J_p$ : Drug flux into pathway

收稿日期: 2003-12-24

基金项目: 国家自然科学基金项目 (50147009 和 50377039)

通讯作者: 包家立, 电话: (0571)87217390,

E-mail: baojl@zju.edu.cn

设  $J_d$  为药物从皮肤外侧流入通道内的通量,  $J_r$  为药物流出通道的通量,  $J_p$  为药物留存在通道内的通量。由(1)式可以得到:

$$J_d = J_r + J_p \quad (3)$$

留存在通道内药物  $m_p$  与浓度  $c_p$  的关系为:

$$c_p = \frac{m_p}{V_p} \quad (4)$$

其中:  $V_p$  为通道容积。在  $0 \sim T$  时间内, 流入并留存在通道内的药物为:

$$m_p = \int_0^T J_p dt \quad (5)$$

对(5)式微分, 并将(4)式代入, 留存在通道内的药物通量为:

$$J_p = V_p \frac{dc_p}{dt} \quad (6)$$

根据 Fick 原理, 对  $X$  长度的通道, 流出通道的药物通量为:

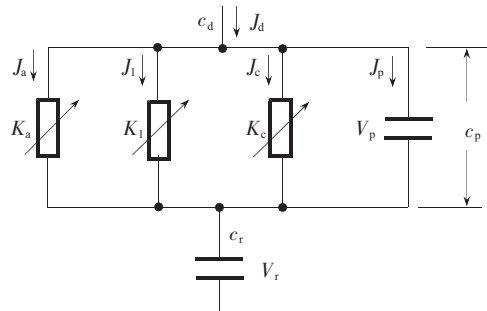
$$J_r = \frac{D_T}{X} (c_d - c_r) = \frac{D_T}{X} c_p = K_T c_p \quad (7)$$

其中:  $K_T = D_T/X$  为药物经皮转运通道导纳, 反映了通道传导药物的能力;  $D_T$  为扩散系数。在高压脉冲作用下, 药物经皮转运途径有皮肤附属器、脂质域和高压脉冲作用所产生的新通道三种<sup>[3]</sup>。在相同的溶液浓度差 ( $c_d - c_r = c_p$ ) 作用下, 药物可以同时通过这三种途径转运, 并且有:

$$J_r = J_a + J_l + J_c \quad (8)$$

这里:  $J_a$ 、 $J_l$ 、 $J_c$  分别为皮肤附属器、脂质域和高压脉冲所产生新通道三种途径的药物经皮渗透通量。

根据扩散池系统网络热力学模型<sup>[11]</sup>以及(3)、(6)、(7)、(8)式, 我们可以获得药物经皮转运的网络热力学模型, 如图 2 所示,  $V_r$  为接受室容积。



**Fig.2** Network thermodynamic model of pathway for drug transport epidermis contains the drug permeable conductance of appendage  $K_a$ , lipid  $K_l$  and corneocyte  $K_c$ , capacitance of pathway volume  $V_p$ , receptor volume  $V_r$  in side-by-side permeation chambers

当药物溶液一接触到角质层, 角质层则启动药物渗透的过程, 并且经过延迟时间后, 药物渗透通量达到最大, 随后随时间延长渗透通量逐渐减小<sup>[11]</sup>。设  $m$  是药物经皮转运通道的激活因子,  $h$  是失活因子,  $\bar{K}_T$  为  $K_T$  的最大值, 则药物经皮转运通道导纳为:

$$K_T(t) = \bar{K}_T m^6 h \quad (9)$$

激活因子  $m$  符合以下微分方程、初始条件和终止条件:

$$\frac{dm}{dt} = \alpha_m(1-m) - \beta_m m \quad (10)$$

$$m(0) = m_0, \quad m(\infty) = m_\infty \quad (11)$$

解(10)式, 激活因子  $m$  是以指数规律随时间上升,

$$m(t) = m_\infty - (m_\infty - m_0) e^{-t/\tau_m} \quad (12)$$

失活因子  $h$  符合以下微分方程、初始条件和终止条件:

$$\frac{dh}{dt} = \alpha_h h - \beta_h \quad (13)$$

$$h(0) = h_0, \quad h(\infty) = h_\infty \quad (14)$$

并以指数规律随时间下降:

$$h(t) = h_\infty + h_0 e^{-t/\tau_h} \quad (15)$$

当  $\frac{dK_T}{dt} = 0$ , 通道导纳最大。用最小二乘拟合法可以获得出现最大通道导纳的时间。拟合的指标函数为:

$$\Psi = \sqrt{\sum_{i=1}^6 (J_n - K_T(t_i) c_p)^2} \approx \sqrt{\sum_{i=1}^6 (J_n - K_T(t_i) c_d)^2} \quad (16)$$

当  $\Psi$  达到最小值时, 通道导纳理论值  $K_T(t)$  达到最大。

在高压脉冲作用时, 皮肤附属器、脂质域和新通道三种通路同时参与药物的经皮转运, 则:

$$K_T = K_a + K_l + K_c \quad (17)$$

在被动扩散时, 只有皮肤附属器和脂质域两种通路同时参与药物的经皮转运, 则:

$$K_T = K_a + K_l \quad (18)$$

## 3 材料与方法

### 3.1 材料

实验皮肤为人尸胸部皮肤。在自愿者死亡 10 小时内, 从尸体胸部取全皮样本, 用剥皮器剥除全皮下组织和脂肪, 经保存液处理后在  $-80^\circ\text{C}$  超低温冰箱内保存 0~4 周。尸皮组织来自浙江大学医学院人体解剖研究所人体器官库。实验前将皮肤从

冰箱内取出, 在室温下放置 0.5 h 进行复温。皮肤解冻后放置于 60℃ 的热水中 2 min, 用镊子仔细将表皮从全皮上剥离下来。

药品为替硝唑 (丽珠集团湖北科益药业有限公司, 批号 020711), 以 7.26 g/L 在 80℃ 下溶解于生理盐水。当温度下降到 19℃ 时, 溶液中有替硝唑结晶析出。

### 3.2 设备

实验装置为离体扩散池系统。供应室和接受室均为容积  $V_c=2\text{ cm} \times 1\text{ cm} \times 1\text{ cm}=2\text{ cm}^3$  的长方体, 有效扩散面积为  $A_c=1.0\text{ cm}^2$ 。供应室和接受室的两个端面均为铝金属板, 表面积也为  $1.0\text{ cm}^2$ , 相距 40 mm, 经皮电极为 Pt 电极, 通过供应室和接受室电极小孔 (0.5 mm) 插入供应室和接受室至角质层两侧表面, 相距 1 mm。扩散池内放置磁力搅拌子 ( $4 \times \Phi 2.5$ ), 扩散池放置在 85-2 型恒温磁力搅拌器上 (杭州亚美电子设备厂)。经皮给药电穿孔系统 (OX4-4, 浙江大学医学院研制) 提供高压指数衰减型脉冲<sup>[2]</sup>。双道存储示波器 (Agilent 54622A, 美国) 用于监测和记录施加脉冲电压和经皮脉冲电压。

替硝唑样本浓度测量设备为由浙江大学分析测试中心提供的高效液相色谱仪 HPLC (Waters 600, 美国)。检测器为 Waters 2487 双波长紫外检测器; 检测波长 318 nm; 色谱柱:  $4.6 \times 250\text{ mm}$ , 内装 Diamondsil C<sub>18</sub> 5  $\mu\text{m}$ ; 柱温: 25℃; 流动相: 甲醇-0.1%冰醋酸为 25:75; 流速: 1.0 ml/min。

### 3.3 脉冲协议

实验选择了三种脉冲协议 (pulse protocol): H1 协议:  $V_0=141\text{ V}$ ,  $R=1\text{ ppm}$ ,  $N=50$ ,  $C=100\text{ }\mu\text{F}$ ; M2 协议:  $V_0=206\text{ V}$ ,  $R=1\text{ ppm}$ ,  $N=50$ ,  $C=47\text{ }\mu\text{F}$ ; L3 协议:  $V_0=302\text{ V}$ ,  $R=2\text{ ppm}$ ,  $N=50$ ,  $C=22\text{ }\mu\text{F}$ 。脉冲波形均为指数衰减脉冲。

### 3.4 实验方法

准备好的表皮外表面朝向供应室并放置在供应室扩散口, 接受室扩散口复盖在该表皮上, 将供应室与接受室连接、密封。OX4-4 电穿孔仪的正极和负极与扩散池供应室和接受室的铝电极连接, 同时, 连接到双道存储示波器 (Agilent 54622A, 美国) 的通道 1, 监测施加脉冲。扩散池供应室和接受室 Pt 电极连接到双道存储示波器的通道 2, 监测经皮脉冲。扩散池环境温度为 19℃。

实验在四个扩散池上同时进行, 其中一个扩散池做被动扩散实验, 为对照组, 其他三个扩散池做

电穿孔实验, 作为实验组 (H1、M2、L3)。将替硝唑饱和溶液注入到扩散池供应室, 生理盐水注入到扩散池接受室。实验组从 OX4-4 型经皮给药电穿孔仪上按设定的脉冲协议发放脉冲。脉冲发放完毕后, 四个扩散池均按取样时间  $t_i=0, 0.33, 0.67, 1.0, 1.5, 2\text{ h}$  定时从接受室取样。从接受室取出全部接受液样品后, 及时向接受室充满新生理盐水。样品在 HPLC 上测定浓度, 检测限为 0.01 mg/L。进样前每个样品过滤, 样本进样量为 20  $\mu\text{l}$ , 替硝唑保留时间为 10.42 min。根据取样时间计算各时间点替硝唑经角质层的渗透通量, 计算方法见参考文献 13。

## 4 结 果

对照组 (control) 和实验组 (H1、M2、L3) 在各取样时间 ( $t_i=0, 0.33, 0.67, 1.0, 1.5, 2\text{ h}$ ) 所获得的接受液替硝唑含量均高于检测限 0.01 mg/L, 表明无论是被动扩散还是增强扩散, 扩散池系统都会形成由供应室向接受室扩散的替硝唑渗透, 其渗透通量如表 1 所示。同时还可以看出: 实验组在各种脉冲协议中, 替硝唑的经皮渗透通量均高于对照组, 表明脉冲电场有促进药物经皮渗透的作用。H1 协议下的药物经皮渗透通量比 M2 协议和 L3 协议均高, M2 协议又比 L3 协议高, 表明并不是脉冲电压愈高, 药物的经皮渗透通量也愈高, 而与所用的蓄能电容量有关。电容量愈大, 药物的经皮渗透通量愈高。

**Table 1** Tinidazole permeable flux ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$ ) acrossed epidermis at 0, 0.33, 0.67, 1, 1.5 and 2 h after using variable pulse for protocols H1, M2 and L3

Pulse protocol	Sampling time (h)					
	0	0.33	0.67	1	1.5	2
Control	0.43	0.29	0.07	3.11	0.52	0.04
H1	8.76	13.12	5.45	3.15	2.25	3.04
M2	3.68	7.22	5.2	3.82	2.99	2.67
L3	3.56	4.96	3.12	2.1	2.45	4.78

根据表 1 替硝唑经皮渗透通量的实验结果, 用最小二乘拟合原理, 计算对照组 (control) 和实验组 (H1、M2、L3) 四种状态下药物经皮转运通道激活因子的初值  $m_0$ 、终值  $m_\infty$ 、时间常数  $\tau_m$ , 失活因子的初值  $h_0$ 、终值  $h_\infty$ 、时间常数  $\tau_h$ , 如表 2 所

示。根据表 2 的计算结果,用(9)、(12)和(15)式可以绘出对照组 (control) 和实验组 (H1、M2、L3) 的理论线,如图 3 所示。从表 2 可以看出:实验组的激活因子初值  $m_0$  比对照组要高一个数量级;而实验组激活因子时间常数  $\tau_m$  却比对照组低。实验组的失活因子初值  $h_0$  与对照组相同;实验组失活因子时间常数  $\tau_h$  比对照组高。

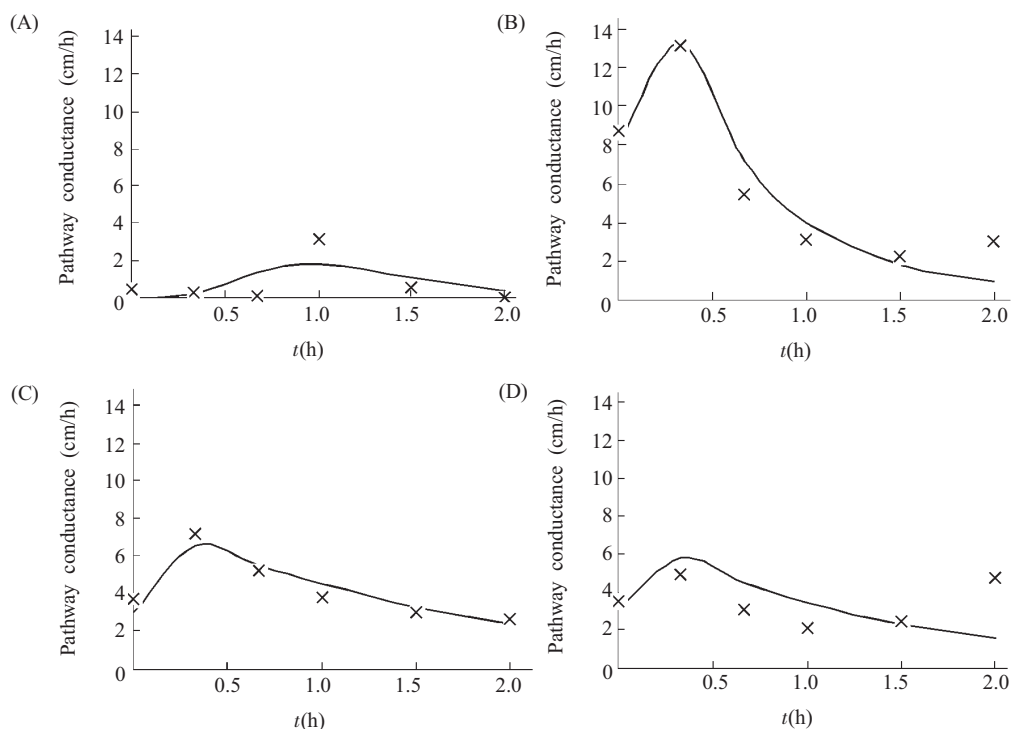
**Table 2** Activation and inactivation factor of pathway's Tinidazole permeable conductance include calculating values of initial  $m_0$ , final  $m_\infty$  and time constant  $\tau_m$  for activation and initial  $h_0$ , final  $h_\infty$  and time constant  $\tau_h$  for inactivation. Fitting experiment data with theoretical value is judged by critical function  $\Psi$

	Control	H1	M2	L3
$m_0$	0.10	1.65	1.40	1.40
$m_\infty$	3.30	2.00	1.66	1.64
$\tau_m$	0.90	0.10	0.10	0.10
$h_0$	0.40	0.40	0.40	0.40
$h_\infty$	0.00001	0.0080	0.00001	0.0041
$\tau_h$	0.30	0.50	1.60	1.20
$\Psi$	1.9618	2.9169	1.2416	3.9069

## 5 讨 论

从图 3 可以看到,在高压脉冲发放结束后的 0~1 h 内,药物的经皮浸透通量可以达到最大,之后,浸透通量逐渐减小,这个现象与 Prausnitz<sup>[14]</sup>和 Vanbever<sup>[15]</sup>观察到的药物经皮浸透通量下降现象是一致的。从图 2 模型分析,皮肤附属器、脂质域和高压脉冲产生新通道的通道导纳  $K_a$ 、 $K_i$ 、 $K_c$  具有时间依赖性,它们受皮肤附属器实质、脂质双层分子、系统能量等许多因素的影响。可以看到脉冲电压愈高,药物经皮浸透通量下降时间愈长,这可能是高压脉冲对角质细胞产生了可逆性低或不可逆损伤。

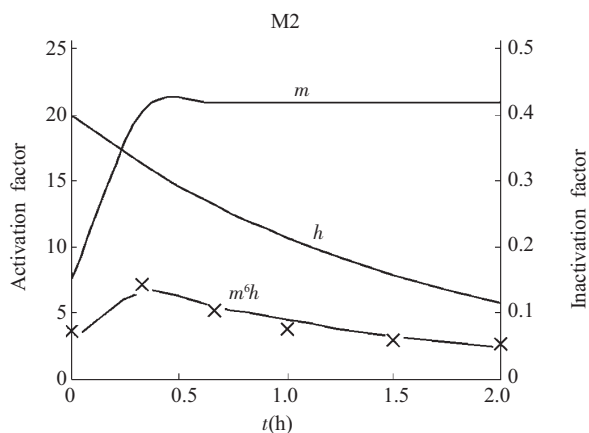
实验结果与理论线比较 (图 3) 表明,在药物经皮转运的通道中确实存在通道激活因子和失活因子,这些因子控制着通道的开放和关闭,对研究药物经皮渗透机理起重要的作用。把(9)式分解来看,激活因子以 6 次方指数的形式快速上升,而失活因子则以指数的形式缓慢下降,如图 4 所示。这个现象表明无论是在被动扩散还是在电脉冲增强扩散中,在药物与皮肤相接触的初期,总会有一定量的药物通过皮肤渗透。激活因子比失活因子多 6 个



**Fig.3** The comparison of theoretical (see Equation 9, 12 and 15) time-conductance characteristic of Tinidazole (—) with experiment data (x). (A) control; (B) H1; (C) M2; (D) L1



次方,表明在促渗过程中,皮肤通道的激活几率远高于失活几率。被动扩散产生的这种现象可能是药物干扰了角质层上的脂质域,使脂质域产生结构紊乱。电脉冲增强扩散产生的这种现象可能是在脂质域结构紊乱的基础上增加了脉冲电场在皮肤上产生的新通道。



**Fig.4** Pathway's Tinidazole permeable conductance in different time.  $m$ : Activation factor;  $h$ : Inactivation factor;  $m^h$ : Superposition of both factors.  $\times$ : Experiment data obtained from pulse protocol M2

从表2看出,电脉冲增强扩散中的激活因子初值 $m_0$ 均比被动扩散高,并且采用任何一种脉冲协议,电脉冲增强扩散中的 $m_0$ 均相等或相近。这种现象提示我们在电脉冲作用于皮肤时,皮肤上的通道已被激活,并且与脉冲协议没有太大的关系,而与皮肤的性质(如皮肤部位、皮肤年龄、皮肤的脂水性等等)有关, $m_0$ 可能是评价皮肤渗透性质的一个特异性的指标。

#### 参考文献:

[1] Weaver JC, Vaughan TE, Chizmadzhev YA. Theory of electrical creation of aqueous pathways across skin transport barriers. *Adv Drug Deliv Rev*, 1999;35(1):21~39  
 [2] Weaver JC, Chizmadzhev YA. Theory of electroporation: a review. *Bioelectrochem Bioenerg*, 1996;41:135~160

[3] Chizmadzhev YA, Zamitsin VG, Weaver JC, Potts UO. Mechanism of electroinduced ionic species transport through a multilamellar lipid system. *Biophysical J*, 1995;68:749~765  
 [4] Chizmadzhev YA, Indenbom AV, Kuzmin PI, Galichenko SV, Weaver JC, Potts RO. Electrical properties of skin at moderate voltages: contribution of appendageal macropores. *Biophys J*, 1998;74:843~856  
 [5] Zewert T, Pliquett U, Langer R, Weaver JC. Transdermal transport of DNA antisense oligonucleotides by electroporation. *Biochem Biophys Res Comm*, 1995;212(2):286~292  
 [6] Pliquett UF, Vanbever R, Preat V, Weaver JC. Local transport regions LTRs in human stratum corneum due to long and short 'High Voltage' pulses. *Bioelectrochem Bioenerg*, 1998;47:151~161  
 [7] Pliquett UF, Zewert TE, Chen T, Langer R, Weaver JC. Imaging of fluorescent molecule and small Ion transport through human stratum corneum during high voltage pulsing: local transport regions are involved. *Biophys Chem*, 1996;58:185~204  
 [8] Pliquett UF, Gusbeth CA. Perturbation of human skin due to application of high voltage. *Bioelectrochemistry*, 2000;51:41~51  
 [9] Martin GT, Pliquett U, Weaver JC. Theoretical analysis of localized heating in human skin subjected to high voltage pulses. *Bioelectrochemistry*, 2002;57:55~64  
 [10] Pawlowski P, Gallo SA, Johnson PG, Hui SW. Electrorheological modeling of the permeabilization of the stratum corneum: theory and experiment. *Biophysical J*, 1998;75:2721~2731  
 [11] 包家立, 王红, 葛霁光. 药物经离体角质层渗透的非平衡态特性. *药学学报*, 2004;39(4):296~300  
 [12] 包家立, 葛霁光. 经皮给药电穿孔系统. 中国发明专利申请, 02137570.4, 2002.10.20  
 [13] 王红, 包家立, 王会平, 葛霁光, 俞治平. 物质经皮转运的唯象理论. *生物物理学报*, 2004;20(1):55~64  
 [14] Prausnitz MR, Bose VG, Langer R, Weaver JC. Electroporation of mammalian skin: a mechanism to enhance transdermal drug delivery. *Proc Natl Aca Sci USA*, 1993;90:10504~10508  
 [15] Vanbever R, Lecouturier N, Preat V. Transdermal delivery of metoprolol by electroporation. *Pharm Res*, 1994;11(11):1657~1662

## NETWORK THERMODYNAMICS MODEL OF PATHWAY CONDUCTANCE FOR DRUG TRANSPORT THROUGH SKIN

BAO Jia-li<sup>1,2</sup>, YANG Yuan-yuan<sup>1</sup>, WANG Hong<sup>2</sup>, GE Ji-guang<sup>2</sup>, WANG Hui-ping<sup>1</sup>

(1. College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310006, China;

2. College of Life Science, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China;

3. Hangzhou Genomics Institute, Hangzhou 310008, China)

**Abstract:** The pathway conductance properties of epidermis for transdermal drug delivery is expounded. Quantitative relationship of the drug permeable flux passing skin with pathway consistency of epidermis in side-by-side permeation chamber is described by network thermodynamics model. It is considered that pathway conductance for drug through skin is regulated by activation and inactivation factors. From completed passive (control) and electrical pulse (experiments) experiments with Tinidazole, the results showed that theoretical curves of pathway conductance of epidermis fitted very well with the data from these experiments. So the conclusion is that initial activation factor ( $m_0$ ), time constant of activation ( $\tau_m$ ), initial inactivation factor ( $h_0$ ), and time constant of inactivation ( $\tau_h$ ) are believed to be very important indexes for analysis of property of pathway conductance of drug transport through skin.

**Key Words:** Transdermal drug delivery; Pathway conductance; Network thermodynamics model