

不同浓度氮酮、薄荷醇对盐酸特比萘芬体外经皮渗透作用的影响

蔡文贺,林德贵*

(中国农业大学动物医学院,北京 100193)

摘要:为选择促进盐酸特比萘芬(TBF)透皮扩散作用的促渗剂,选用立式 Franz 扩散池,以犬离体皮肤为透皮屏障,通过计算含不同浓度氮酮(AZ)、薄荷醇(MT)组盐酸特比萘芬透皮试验的累积渗透量 Q 、稳态流速 J_{ss} 、渗透系数 K_p 和增渗比 ER 等参数来比较促渗效果。结果显示试验中所有组别促渗剂都具有促渗作用,作用由强至弱依次为 $1\%AZ^{**} > 5\%MT^{**} > 3\%AZ^{**} > 3\%MT^{**} > 1\%MT^* > 5\%AZ^*$,其中薄荷醇组促渗效果与浓度呈线性正相关,而氮酮组则呈线性负相关。虽然各组促渗剂均起促进作用,但薄荷醇组的效果优于氮酮组,加之薄荷醇属天然物质,毒副作用低,所以更适合作为药物外用制剂的促渗剂。

关键词:氮酮;薄荷醇;盐酸特比萘芬;促渗剂;经皮渗透

中图分类号:S859.798

文献标识码:A

文章编号:0366-6964(2009)08-1249-04

Effect of the Various Concentration of Azone and Menthol on the *in vitro* Percutaneous Penetration of Terbinafine through Excised Canine Epidermis

CAI Wen-he, LIN De-gui*

(College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract: This experiment was conducted to study permeation-enhancing effect of various concentration of Azone and menthol on the *in vitro* percutaneous penetration of terbinafine (TBF) through canine epidermis. Modified Franz vertical glass diffusion cells were used and excised canine epidermis was chose as transdermal barrier. The *in vitro* permeation effects of every combination of TBF with various concentration enhancers were evaluated through calculating and comparing the cumulative penetration amount, steady-state flux, permeability coefficient and enhancement ratio. The results revealed that various concentration of enhancers had the permeation-enhancing effect, the sequence of effect was $1\%AZ^{**} > 5\%MT^{**} > 3\%AZ^{**} > 3\%MT^{**} > 1\%MT^* > 5\%AZ^*$. The linear correlation between the effect of combinations of TBF with menthol and the concentration of menthol was positive, while the linear correlation between the effect of combinations of TBF with Azone and the concentration of Azone was negative. Though all combinations of TBF with enhancers had the enhancement effect, the effect of menthol was better than that of Azone. Besides, the menthol is a natural product with low toxicity and side effect, so it is a preferable enhancer for the external preparation.

Key words: Azone; menthol; terbinafine; enhancers; percutaneous penetration

盐酸特比萘芬(Terbinafine)是由瑞士山道士公司开发的一种新型丙烯胺类抗真菌药,通过高选择

收稿日期:2008-11-28

作者简介:蔡文贺(1983-),男,硕士,主要从事犬猫皮肤疾病研究,E-mail: supercai_321@163.com

* 通讯作者:林德贵,E-mail: csama@sina.com

性抑制真菌细胞膜内麦角甾醇合成过程中的鲨烯环氧化酶使鲨烯积聚而产生杀菌作用^[1]。虽然它比咪唑类及灰黄霉素的毒性小,但口服后仍有较强的副作用,使其应用一直存在局限性。如果能研制出渗透效果出色的外用制剂,对疾病的治疗意义重大。因此作者以盐酸特比萘芬(TBF)为模型药物,比较氮酮和薄荷醇的促渗作用,为研制渗透效果更强的外用盐酸特比萘芬制剂提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

高效液相色谱仪(美国 SSI/Lab Alliance 公司),立式透皮扩散仪(上海锴凯科贸有限公司),电子天平(瑞士 METTLER-TOLEDO 公司),精密 pH 计(瑞士 METTLER-TOLEDO 公司),电动脱毛器(美国 Oster 公司)。盐酸特比萘芬对照品(中国药品生物制品检定所),盐酸特比萘芬样品(诺华制药公司),氮酮(国药集团化学试剂有限公司),薄荷醇(国药集团化学试剂有限公司),色谱级甲醇(美国 Fisher 公司),磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、氯化钠、氯化钾、氢氧化钠、乙醇(分析纯,国药集团化学试剂有限公司),成年健康杂种实验犬(中国农业大学动物医院提供)。

1.2 分析方法的建立

1.2.1 色谱条件选择 色谱柱为 ODS 柱(250 mm×4.6 mm),流动相选择乙腈-水(95:5),检测波长:283 nm,柱温:25℃,流速:1 mL·min⁻¹,进样量:20 μL。

1.2.2 标准曲线的绘制 准确称取 5.0 mg 盐酸特比萘芬对照品,置于 50 mL 容量瓶中,用流动相溶解并定容,即得 100 μg·mL⁻¹标准品溶液,准确稀释为 80、60、40、20、10、5、1、0.5、0.1、0.05 μg·mL⁻¹标准品溶液,各取 20 μL 进样检测,以峰面积 A 对其相应浓度 c(μg·mL⁻¹)进行回归,得到回归方程:A = 24 045c + 1 497, R² = 0.999 5。

1.2.3 样品含量的测定 准确称取相同质量的盐酸特比萘芬对照品及样品,加流动相配制成 10 μg·mL⁻¹溶液,各取 20 μL 进样检测,利用外标法计算样品有效浓度为 62.37%。

1.2.4 日内与日间偏差的测定 取含量为 20 μg·mL⁻¹对照品溶液测定,1 d 内连续进样 5 次, RSD 为 0.81%;每天进样 1 次,连续 3 d, RSD 为 1.56%。

1.3 透皮扩散试验

1.3.1 离体皮肤的制备 选取体质量约 5 kg 的杂种犬,实施安乐死,电动脱毛器剔除躯干部的犬毛,使用手术刀和手术剪取下选取的皮肤,尽量剥离皮下组织,用生理盐水将剥离的犬皮冲洗干净,进一步剔除皮下组织及真皮层,使用滤纸吸干犬表皮中的水分,装入密封袋中,做好标记,置于-20℃冰箱中保存备用^[2]。

1.3.2 释放液和接受液的配制 根据计算结果准确移取高浓度薄荷醇和氮酮储备液于 10 mL 容量瓶中,加入准确称取的 100 mg 盐酸特比萘芬样品,再加无水乙醇溶解并至刻度线,即得含有不同浓度促渗剂且盐酸特比萘芬浓度为 10 mg·mL⁻¹的透皮释放液。透皮接受液使用 pH7.4 的磷酸盐缓冲液。

1.3.3 皮肤的预处理 冷冻的离体皮肤在室温下解冻后,按照扩散池尺寸裁剪并固定,向释放池和接受池中分别加入 pH7.4 的磷酸盐缓冲液,置于透皮扩散实验中(37℃水浴,200 r·min⁻¹磁力搅拌)平衡 30 min,之后吸净释放池中液体,准备正式试验。

1.3.4 透皮扩散试验 向释放池中加入 2 mL 透皮释放液,37℃水浴,200 r·min⁻¹磁力搅拌条件下,分别在 2、4、8、12、24 h 各取出 2 mL 接受液进样检测药物浓度。

1.4 数据处理

将每次测定的浓度代入下列公式中,可计算出药物的累积渗透量 Q(μg·cm⁻²·h⁻¹)^[3]:

$$Q_n = \frac{C_n \cdot V_0 + \sum_{i=1}^{n-1} C_i \cdot V_i}{A}$$

公式中 C_n 代表第 n 次取样点的药物浓度(μg·mL⁻¹),C_i 代表第 i 次取样点的药物浓度(μg·mL⁻¹),A 代表扩散池有效面积(cm²)。V₀ 代表接受池体积(mL),V_i 代表取样体积(mL)。根据计算出的 Q 绘制出它对时间 t 的曲线,即 Q-t 方程,方程中的斜率即表示此条件下盐酸特比萘芬经皮渗透的稳态流速(J_{ss}),令 Q = 0 时的 t 值即表示此条件下的时滞(T_{lag})。渗透系数(K_p)是稳态流速(J_{ss})与释放池中药物原始浓度的比值,增渗比(ER)则是含不同浓度促渗剂组的渗透系数(K_p)与对照组渗透系数(K_p)的比值,它可以更直观地反映出各组促渗作用的强弱。数据组间比较采用 t 检验。

2 结 果

2.1 不同浓度促渗剂对 TBF 经皮累积渗透量的影响

不同浓度氮酮和薄荷醇对盐酸特比萘芬经皮累

积渗透量的影响见表 1。结果表明 3 种浓度氮酮对 TBF 均有促渗作用,累积渗透量与其浓度呈负相关;3 种浓度薄荷醇均有明显促渗作用,而且累积渗透量与其浓度呈正相关。

表 1 含不同浓度促渗剂的盐酸特比萘芬累积渗透量(Q)($\bar{x} \pm s$, n=3)

促渗剂 Enhancers		累积渗透量(Q) Cumulative penetration amount				
种类 Kind	剂量/% Dosage	2 h	4 h	8 h	12 h	24 h
Control	0	0.256±0.013	0.460±0.068	0.928±0.011	1.443±0.018	2.744±0.019
氮酮 Azone	1	0.409±0.020**	0.871±0.009**	1.764±0.029**	2.533±0.013**	5.262±0.073**
	3	0.415±0.026**	0.749±0.046**	1.552±0.074**	2.280±0.164**	4.578±0.316**
	5	0.264±0.030	0.475±0.043	0.949±0.057	1.477±0.088	2.855±0.079
薄荷醇 Menthol	1	0.290±0.030*	0.532±0.027*	1.030±0.093	1.599±0.214	3.110±0.213*
	3	0.377±0.033**	0.728±0.101**	1.372±0.115**	2.053±0.060**	3.998±0.212**
	5	0.449±0.075**	0.870±0.096**	1.683±0.099**	2.441±0.041**	4.790±0.173**

与对照组相比,**.差异极显著($P<0.01$);*.差异显著($P<0.05$)。下表同

Compared with control group,** means very significant difference, $P<0.01$; * means significant difference, $P<0.05$. The same as below

2.2 不同浓度促渗剂对 TBF 经皮渗透结果的影响

根据表 2、表 3 内容可知,3 种浓度的氮酮和薄荷醇对盐酸特比萘芬经皮渗透的稳态流速(J_{ss})、渗透系数(K_p)和增渗比(ER)均有促进作用,除 5% AZ 和 1% MT 组外,其余组稳态流速与对照组相比均有极显著差异,各组作用由强至弱依次为 1% AZ** > 5% MT** > 3% AZ** > 3% MT** > 1% MT* > 5% AZ*。

1%、3%、5% MT 对盐酸特比萘芬有较强的促

渗作用,与对照组相比,渗透速率分别是其的 1.131、1.442、1.726 倍。经过分析,盐酸特比萘芬的 J_{ss} 在 1%~5% MT 间呈正相关,线性方程为 $y = 0.017x + 0.1124$, $R^2 = 0.9993$ 。

1%、3%、5% AZ 对盐酸特比萘芬的促渗作用有强有弱,与对照组相比,渗透速率分别是其的 1.926、1.667、1.041 倍。经过分析,盐酸特比萘芬的 J_{ss} 在 1%~5% AZ 间呈负相关,线性方程为 $y = -0.0252x + 0.2516$, $R^2 = 0.9458$ 。

表 2 含不同浓度促渗剂的盐酸特比萘芬稳态流速(J_{ss})、时滞(T_{lag})

Table 2 The steady-state flux and T_{lag} of TBF with various concentration of enhancers

促渗剂 Enhancers	回归方程 Regression Equation	R^2	稳态流速/ $(\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h})$ J_{ss}	时滞/h T_{lag}
Control(0%)	$Q = 0.114t + 0.027$	0.999 2	0.114±0.001	-0.235
1% Azone	$Q = 0.219t - 0.027$	0.999 5	0.219±0.003**	0.121
3% Azone	$Q = 0.190t + 0.016$	0.999 9	0.190±0.014**	-0.083
5% Azone	$Q = 0.119t + 0.018$	0.999 5	0.119±0.002*	-0.149
1% Menthol	$Q = 0.129t + 0.024$	0.999 7	0.129±0.007*	-0.185
3% Menthol	$Q = 0.164t + 0.063$	0.999 9	0.164±0.010**	-0.380
5% Menthol	$Q = 0.197t + 0.081$	0.999 9	0.197±0.007**	-0.410

表3 含不同浓度促渗剂的盐酸特比萘芬渗透系数(K_p)、增渗比(ER)

Table 3 The permeability coefficient and enhancement ratio of TBF with various concentration of enhancers

促渗剂 Enhancers	渗透系数 K_p	增渗比 ER
Control(0%)	1.139×10^{-5}	-
1% Azone	$2.194 \times 10^{-5}^{**}$	1.926 ^{**}
3% Azone	$1.899 \times 10^{-5}^{**}$	1.667 ^{**}
5% Azone	$1.186 \times 10^{-5}^*$	1.041 [*]
1% Menthol	$1.288 \times 10^{-5}^*$	1.131 [*]
3% Menthol	$1.643 \times 10^{-5}^{**}$	1.442 ^{**}
5% Menthol	$1.966 \times 10^{-5}^{**}$	1.726 ^{**}

数据表明 AZ 组与 MT 组时滞均随其浓度增加而缩短,但是两者间的线性关系却很小,线性方程分别为: $y = -0.0675x + 0.1655$ ($R^2 = 0.9199$)与 $y = -0.0563x - 0.1563$ ($R^2 = 0.848$)。

3 讨论

经皮给药系统(TTS)由于具有避免肝脏的首过效应、毒副作用低、维持稳定持久的血药浓度、给药方便,且可减少给药次数等优点,近年来颇受研究者的青睐^[4-6]。在众多的开发思路中,选择有效透皮促渗剂是其中之一。

表皮中角质层是机体正常保护屏障之一,可以有效保护机体内环境不被外界侵害,所以它也就成为药物有效透过皮肤进入体循环需要克服的最大障碍。正常情况下,只有少数具有理想理化性质的药物才可以透过皮肤进入体内达到有效治疗浓度^[7]。促渗剂的作用就是降低角质层的屏障能力,使得药物能够快速、容易地透过皮肤来治疗疾病。

氮酮是目前最常用的一类促渗剂,它属于人工合成物质,作用机理是通过增强脂质双分子层的流动性来促进药物透过表皮细胞。有研究表明,氮酮对水溶性药物的促渗作用强于脂溶性药物,虽然盐酸特比萘芬是一种脂溶性药物,本试验的结果却表明不同浓度氮酮对其均产生促渗作用,只是氮酮的促渗能力与其浓度呈明显线性负相关。

薄荷醇属于萜烯类物质,是一种天然提取物,其促渗作用很早就运用于中医,即“芳香走窜,引药上行”,“独行则势弱,佐使则有功”^[8]。由于较低的毒副作用和良好的刺激性,薄荷醇作为促渗剂被广泛应用于经皮给药系统^[9]。薄荷醇促渗的机理是通过

破坏角质细胞间质,造成角质层裂解剥脱,使表皮细胞间隙扩大,致使皮肤对外来药物的阻滞作用减小,从而促进药物经表皮细胞间隙透皮扩散^[10]。在本试验中,3种浓度的薄荷醇均产生明显促渗作用,而且促渗能力与其浓度呈明显线性正相关。

本试验结果表明,虽然低浓度氮酮与薄荷醇对盐酸特比萘芬透皮扩散均产生促进作用,但是薄荷醇作为一种天然提取物,其对于机体的毒副作用以及刺激性均低于氮酮,加之味辛、凉,所以更适用于药物外用制剂的促渗剂。

参考文献:

- [1] ABRAZZO G K, PROMTLING R A, TUMBULL T A, et al. Effects of bifonazole, fluconazole, itraconazole, and terbinafine on the chemiluminescence response of immune cells [J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 1987, 20: 61-68.
- [2] MILLS P C, CROSS S E. Transdermal drug delivery: basic principles for the veterinarian [J]. *The Veterinary Journal*, 2006, 172: 218-233.
- [3] 郑俊民. 经皮给药新剂型[M]. 北京:人民卫生出版社, 2006: 247.
- [4] 杨晓春, 张强, 吴镭. 目前我国透皮给药系统研究的基本思路[J]. *中国新药杂志*, 2001, 10(5): 321-324.
- [5] MITRAGOTRI S. Synergistic effect of enhancers for transdermal drug delivery [J]. *Pharmaceutical Research*, 2000, 17: 1354-1359.
- [6] NOKHODCHI A, SHOKRI J, DASHBOLAGHI A. The enhancement effect of surfactants on the penetration of lorazepam through rat skin [J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2003, 250: 359-369.
- [7] KIM Y C, PARK J H, LUDOVIC P J. Synergistic enhancement of skin permeability by N-lauroylsarcosine and ethanol [J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2008, 352: 129-138.
- [8] 陈群. 冰片促透作用的研究进展[J]. *时珍国医国药*, 2004, 9: 15.
- [9] JANTHARAPRAPAP R, STAGNI G. Effects of penetration enhancers on in vitro permeability of meloxicam gels [J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2007, 343: 26-33.
- [10] PANCHAGNULA R, DESU H, JAIN A, et al. Effect of lipid bilayer alteration on transdermal delivery of a high-molecular-weight and lipophilic drug: studies with paclitaxel [J]. *Journal of Pharmaceutical Science*, 2004, 93(9): 2177.