

超饱和体系改善阿昔洛韦脂肪酸酯前体药物的透皮递送[△]

周 焯^{1*}, 张 琴^{1,2}, 顾 悦¹, 金怡兰¹, 许晓乐¹, 陈 勇^{1,3#}(1.南通大学药学院, 江苏南通 226001; 2.南通市食品药品监督管理局, 江苏南通 226005; 3.南通联科药业有限公司, 江苏南通 226009)

中图分类号 R944.9 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2021)16-1975-07
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2021.16.10



摘要 目的:制备亲脂性阿昔洛韦(ACV)前体药物的超饱和体系,增加ACV的皮肤生物利用度。方法:采用酸酐酰化法合成ACV的乙酸酯(ACV-Ace)、丁酸酯(ACV-But)和己酸酯(ACV-Hex)等3种ACV前体药物。使用核磁共振氢谱、高分辨质谱确证ACV及3种ACV前体药物的结构;采用超高效液相色谱-三重四极杆串联质谱法测定ACV及3种ACV前体药物的浓度,并计算其在不同体积分数的丙二醇-水溶液中的饱和和溶解度,筛选出超饱和体系形成潜力最大的化合物。通过共溶剂法制备该化合物的超饱和体系,并采用光学显微镜观察羟丙基甲基纤维素E3(HPMC E3)对其物理稳定性的影响。采用立式Franz扩散池研究超饱和度和(DS)和HPMC E3对该超饱和体系在离体猪皮上作用1 h后药物皮肤蓄积量的影响,采用冷冻层切-分层定量法测定使用上述超饱和体系和上市阿昔洛韦乳膏1 h后药物在离体猪皮中的分布情况。结果:3种ACV前体药物均被成功合成。建立的定量方法符合生物样品分析要求。在3种前体药物中,ACV-Hex显示出最小的水饱和和溶解度 $[(0.5 \pm 0.0) \text{ mmol/L}]$ 和最大的丙二醇饱和和溶解度 $[(53.4 \pm 14.2) \text{ mmol/L}]$,具备形成具有较高DS的超饱和体系的潜力。在10%丙二醇-水体系中,HPMC E3的加入可保证DS不超过4的ACV-Hex超饱和体系在1 h内保持物理稳定。含有HPMC E3的DS为4的ACV-Hex超饱和体系作用1 h后的总皮肤蓄积量(ACV+ACV-Hex)高于DS<4或不含HPMC E3的ACV-Hex超饱和体系作用后的总皮肤蓄积量;另外,上述超饱和体系渗透进入基底表皮层(皮肤厚度为100~160 μm)的ACV量显著高于上市药品阿昔洛韦乳膏($P<0.05$)。结论:ACV的亲脂性前体药物ACV-Hex可在HPMC E3存在下,于10%丙二醇-水体系中形成稳定的DS为4的超饱和体系;其作用于离体皮肤1 h后可在基底表皮层蓄积较高浓度的ACV,可能对局部治疗单纯疱疹病毒皮肤感染具有一定价值。

关键词 阿昔洛韦;亲脂性前体药物;超饱和体系;皮肤感染;单纯疱疹病毒

Improvement of Transdermal Delivery of Aciclovir Aliphatic Ester Prodrugs by Using Supersaturated System

ZHOU Ye¹, ZHANG Qin^{1,2}, GU Yue¹, JIN Yilan¹, XU Xiaole¹, CHEN Yong^{1,3}(1. School of Pharmacy, Nantong University, Jiangsu Nantong 226001, China; 2. Nantong Food and Drug Supervision and Inspection Center, Jiangsu Nantong 226005, China; 3. Nantong Novast Pharmaceutical Ltd., Jiangsu Nantong 226009, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To prepare supersaturated system of lipophilic aciclovir (ACV) prodrug, and to increase the cutaneous bioavailability of ACV. **METHODS:** Three prodrugs of ACV were synthesized by anhydride acylation, i.e. aciclovir acetate (ACV-Ace), butyrate (ACV-But) and hexanoate (ACV-Hex). The structures of ACV and three ACV prodrugs were confirmed by ¹H-NMR and HRESI-MS; the concentrations of ACV and three ACV prodrugs were determined by UPLC-triple quadrupole tandem mass spectrometry, and saturated solubility of them in different volume fractions of propylene glycol-water solution was calculated. The compound with the greatest potential of form supersaturated system was screened out. The supersaturated system of that compound was prepared by co-solvent method. The effect of hydroxypropyl methylcellulose E3 (HPMC E3) on its physical stability was observed by light microscope. Vertical Franz diffusion cells were used to study the effects of degree of supersaturation (DS) and HPMC E3 on the deposited amount of drug in the excised porcine skin after using the supersaturated system for 1 h. The distribution of ACV in the excised porcine skin was determined by frozen slicing stratified quantitative method after using the supersaturated system and marketed aciclovir cream for 1 h. **RESULTS:** Three ACV prodrugs were successfully synthesized. The established quantification methods met the requirements of biological sample analysis. Among all of the three ACV prodrugs, ACV-Hex showed the lowest saturated solubility in water $[(0.5 \pm 0.0) \text{ mmol/L}]$ and the highest saturated solubility in propylene glycol $[(53.4 \pm 14.2) \text{ mmol/L}]$, which made it potentially feasible to form supersaturated system with high DS. In 10% propylene glycol-water system, the addition of HPMC E3 enabled ACV-Hex supersaturated systems, with DS no more than 4, to maintain physical stability within 1 h. The total deposited amount (ACV + ACV-Hex) in skin after the

[△] 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81603044);中国博士后科学基金资助项目(No.2017M611886)

* 硕士研究生。研究方向:新型制剂及分析。E-mail:zy_2018@163.com

通信作者:副教授,硕士生导师,博士。研究方向:药剂学。E-mail:scuchen2003@163.com

application of ACV-Hex supersaturated system with DS of 4 for 1 h was higher than that after the application of ACV-Hex supersaturated system with DS less than 4 or without HPMC E3. In addition, the concentration of ACV in the basal epidermis (skin thickness was 100-160 μm) by supersaturated system was significantly higher than that of the marketed aciclovir cream ($P < 0.05$). CONCLUSIONS: ACV-Hex, the lipophilic prodrug of ACV, can form stable supersaturated system with DS of 4 in 10% propylene glycol-water system in the presence of HPMC E3. High concentration of ACV could be accumulated in the basal epidermis after the skin was exposed to supersaturated system for 1 h, which may be valuable for local treatment skin infection of herpes simplex virus.

KEYWORDS Aciclovir; Lipophilic prodrug; Supersaturated system; Skin infection; Herpes simplex virus

阿昔洛韦(aciclovir, ACV)是一种无环嘌呤核苷类似物,可高效抑制单纯疱疹病毒(HSV),临床用于治疗皮肤、黏膜等部位的HSV感染^[1]。ACV的口服生物利用度较低(10%~20%)^[2],需较大的口服剂量(约1 g/d)^[3],存在诱发肾衰竭的风险^[4];而静脉注射给药可能诱发静脉炎^[5],使其临床应用受到一定限制。由于HSV可在感染前趋症状期于皮肤基底表皮层大量复制^[6],若能使ACV经皮扩散至该部位,理论上可实现直接靶向治疗,降低ACV的全身暴露量。但ACV的亲脂性差(Log $P = -1.57$)^[7],且水溶性亦差[水溶解度约0.2% (m/V , 37 $^{\circ}\text{C}$)]^[8],导致其外用时难以透过角质层到达靶部位,因此ACV的临床治疗效果有限^[9-10]。

超饱和体系是通过提高药物在溶剂中的热力学活度,从而增加药物的释放及透皮驱动力,最终达到促渗的目的,具有促渗效果明显、成本低廉和使用方便等优点^[11]。在实验室条件下,超饱和体系可通过共溶剂法快速制备,但前提条件是脂溶性目标化合物需要在溶剂A(一般为可与水混溶的有机溶剂,如乙醇、丙二醇等)中的溶解度较好,而在溶剂B(一般为水)中的溶解度差。制备时,首先将目标化合物溶于溶剂A中,再将上述溶液以一定比例与溶剂B混合,在混合瞬间,理论上能产生一系列超饱和度可知的超饱和体系^[12]。然而,因ACV的水溶性和脂溶性均较差,导致了其难以通过该法形成超饱和体系。故笔者设想,若将ACV制成脂溶性前体药物,使其在水中和有机溶剂中的溶解度差距拉大,则有可能利用共溶剂法形成ACV前体药物的超饱和体系。前体药物经皮吸收后,通过皮肤酶水解作用释放原药ACV,从而在皮肤靶部位起效。鉴于此,本研究拟合成和筛选适宜的ACV脂溶性前体药物,并通过共溶剂法将其制备成超饱和体系,以使具有高热力学活度的ACV脂溶性前体药物更易透皮吸收,从而增加ACV的皮肤局部生物利用度,并促进ACV递送至基底表皮层,以期为提高现有ACV皮肤外用制剂的生物利用度提供新的思路。

1 材料

1.1 主要仪器

Acquity®型超高效液相色谱仪串联Xevo®型三重四极杆质谱仪购自美国Waters公司; Gemini NMR 300 MHz型核磁共振波谱仪购自美国Varian公司; API QSTAR® Pulsar ESI-Qtof型高分辨质谱(HRESI-MS)仪购自美国Applied Biosystems公司;立式Franz扩散池由

南通科华玻璃仪器有限公司定做,有效扩散面积为2.0 cm^2 ; Thomas Stadie-Riggs型真皮刀组件购自美国Thomas Scientific公司; YS-100型三目显微镜购自日本Nikon公司; HM 560 Cryostat型切片机购自德国Microm公司; RE-52AA型旋转蒸发仪购自上海亚荣生化仪器厂; HZS-H型恒温水浴振荡器购自哈尔滨东联电子技术开发有限公司; HHS-11-4型电热恒温水浴锅购自海门市恒昌仪器厂; TGL-16B型离心机购自上海安亭科学仪器厂; Milli-Q Advantage A10型超纯水仪购自美国Millipore公司。

1.2 主要药品与试剂

ACV原料药(批号180423,纯度>99%)购自武汉东康源科技有限公司;阿昔洛韦乳膏(批号317005,规格5%)购自福建省三明天泰制药有限公司;羟丙基甲基纤维素E3(HPMC E3,批号7088323)购自日本Shin-Etsu公司;乙腈(批号20095282,色谱纯)购自美国TEDIA试剂公司;丙二醇(批号20171230,分析纯)购自成都市科龙化工试剂厂;柱层析硅胶(粒径100~200 μm ,批号0180172)购自青岛海洋化工厂;OCT冰冻切片包埋剂购自美国Sakura公司;其余试剂均为分析纯,水为超纯水(电阻率>18 $\text{M}\Omega \cdot \text{cm}$)。

1.3 动物

本研究所用动物为雄性尤卡坦猪,体质量为100~150 kg,购自南通市港闸区永兴生猪厂,动物防疫条件合格证号为(苏通)动防合字第20180151号。

2 方法与结果

2.1 ACV前体药物的合成

采用酞酰化法合成ACV前体药物。将ACV原料药1.0 g加热溶解于二甲基甲酰胺(DMF)105 mL中,自然降温至50 $^{\circ}\text{C}$,分别滴加含乙酸酐2.3 g、丁酸酐3.5 g或己酸酐4.8 g的无水吡啶溶液30 mL。反应15 h后,旋转蒸发(真空度0.09 MPa,温度80 $^{\circ}\text{C}$)除去DMF,所得物质经少量甲醇溶解后,与柱层析硅胶5 g混合均匀,旋转蒸发(真空度0.09 MPa,温度50 $^{\circ}\text{C}$,下同)除去甲醇。将所得固态粉末分别加入已装填柱层析硅胶50 g的玻璃层析柱中,以二氯甲烷-甲醇(10:1~20:1, V/V)进行梯度洗脱,收集洗脱液,采用薄层色谱法(TLC)进行产物鉴定,合并相同洗脱部分的洗脱液,旋转蒸发除去溶剂,分别得到ACV前体药物ACV-Ace 0.97 g、ACV-But 0.67 g和ACV-Hex 1.11 g,产率分别为82%、51%和77%。上述产物均为白色粉末状固体;经高效液相色谱-紫外法

($\lambda=254\text{ nm}$)检测,其纯度均大于98%。

2.2 ACV及ACV前体药物的结构确证

通过核磁共振氢谱($^1\text{H-NMR}$)和HRESI-MS确证ACV及3种前体药物的结构及分子量。 $^1\text{H-NMR}$ 谱图中各信号峰的归属以及HRESI-MS的计算值(Calc.)和实测值(Exp.)如下:

2.2.1 ACV 分子式为 $\text{C}_8\text{H}_{11}\text{N}_5\text{O}_3$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ : 3.46 (m, 4H, 12-H, 13-H), 4.67 (s, 1H, 13-OH), 5.34 (s, 2H, 10-H), 6.50 (s, 2H, 2-NH₂), 7.80 (s, 1H, 8-H), 10.63 (s, 1H, 1-NH)。HRESI-MS[M+H]⁺: Calc. 226.093 5, Exp. 226.093 1。上述数据与文献[8]报道的数据基本一致,故确定为ACV。

2.2.2 ACV-Ace 分子式为 $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_4$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ : 1.94 (s, 3H, 2'-H), 3.65 (m, 2H, 12-H), 4.07 (m, 2H, 13-H), 5.33 (s, 2H, 10-H), 6.54 (s, 2H, 2-NH₂), 7.80 (s, 1H, 8-H), 10.67 (s, 1H, 1-NH)。HRESI-MS[M+H]⁺: Calc. 268.104 0, Exp. 268.104 1。

2.2.3 ACV-But 分子式为 $\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{O}_4$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ : 0.86 (m, 3H, 4'-H), 1.49 (m, 2H, 3'-H), 2.21 (m, 2H, 2'-H), 3.67 (m, 2H, 12-H), 4.10 (m, 2H, 13-H), 5.34 (s, 2H, 10-H), 6.52 (s, 2H, 2-NH₂), 7.81 (s, 1H, 8-H), 10.63 (s, 1H, 1-NH)。HRESI-MS[M+H]⁺: Calc. 296.135 3, Exp. 296.135 3。

2.2.4 ACV-Hex 分子式为 $\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{N}_5\text{O}_4$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ : 0.85 (m, 3H, 6'-H), 1.24 (m, 4H, 4'-H, 5'-H), 1.47 (m, 2H, 3'-H), 2.22 (m, 2H, 2'-H), 3.67 (m, 2H, 12-H), 4.10 (m, 2H, 13-H), 5.34 (s, 2H, 10-H), 6.51 (s, 2H, 2-NH₂), 7.84 (s, 1H, 8-H), 10.62 (s, 1H, 1-NH)。HRESI-MS[M+H]⁺: Calc. 324.166 6, Exp. 324.166 1。

2.3 ACV及ACV前体药物含量的测定

采用超高效液相色谱串联质谱法进行测定^[13]。

2.3.1 检测条件 (1)色谱条件:色谱柱为Waters XBridge[®]BEH C₁₈(50 mm×2.1 mm, 2.5 μm), 配备Waters XBridge[®] BEH C₁₈保护柱(5 mm×2.1 mm, 2.5 μm);流动相为0.1%甲酸溶液-乙腈(70:30, V/V);柱温为30 $^{\circ}\text{C}$;流速为0.2 mL/min;进样量为5 μL ;样品管理器温度为8 $^{\circ}\text{C}$ 。(2)质谱条件:采用电喷雾离子源(ESI)在正离子模式下检测,以多反应监测(MRM)模式进行扫描;毛细管电压为2.5 kV;锥孔电压为31 V;离子源温度为160 $^{\circ}\text{C}$;脱溶剂气体(氮气)温度为350 $^{\circ}\text{C}$,脱溶剂气体流量为650 L/h;锥孔气流量为50 L/h;碰撞气体为氩气,碰撞能量为19 eV;定量监测离子对为 m/z 226.2 \rightarrow 152.0 (ACV)、 m/z 268.1 \rightarrow 152.0 (ACV-Ace)、 m/z 296.1 \rightarrow 152.0 (ACV-But)、 m/z 324.2 \rightarrow 152.0 (ACV-Hex)。

2.3.2 样品的制备 (1)空白皮肤提取液:将新鲜小猪皮肤(按“2.6”项下皮肤处理方法操作所得)剪碎,置于玻璃瓶中,加入流动相,置于磁力搅拌器上搅拌1 h,经0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得空白皮肤提取液

样品。(2)供试品溶液:分别精密称取ACV或ACV前体药物适量于量瓶中,用流动相溶解并制成浓度均为5 $\mu\text{mol/L}$ 的贮备液。分别精密量取上述各贮备液适量,以流动相稀释成浓度分别为1 000、750、500、200、100、75、50和15 nmol/L的系列供试品溶液。

2.3.3 方法学考察 按生物样品定量分析方法验证指导原则进行方法学考察^[13]。专属性试验结果显示,空白皮肤对ACV或ACV前体药物的测定均无干扰,提示本方法的专属性较好。以待测物的峰面积为纵坐标(Y)、浓度为横坐标(X)进行线性回归,得到ACV的线性方程为 $Y=838.3X-326.4$ ($r=0.998\ 6$)、ACV-Ace为 $Y=1\ 028.6X-579.8$ ($r=0.994\ 5$)、ACV-But为 $Y=687.4X-308.2$ ($r=0.991\ 8$)、ACV-Hex为 $Y=773.1X-337.4$ ($r=0.992\ 9$)。各化合物均在15~1 000 nmol/L浓度范围内与其峰面积呈良好的线性关系,定量下限均为15 nmol/L。取定量下限(15 nmol/L)和低、中、高浓度(100、500和800 nmol/L) ACV和ACV前体药物的样品溶液进行方法精密度和准确度试验。结果,日内、日间精密度的RSD均小于1%($n=3$)、准确度[(实际浓度/理论浓度)×100%]为95.47%~103.72%(RSD<1.0%, $n=6$),提示方法的精密度和准确度均较好。各待测物的提取回收率均超过90%(RSD<6.5%, $n=6$)。各待测物的基质因子介于0.96~1.08之间,RSD \leq 7.33%($n=6$),提示该方法无明显的离子抑制或增强效应。取上述以空白皮肤提取液配制的ACV和ACV前体药物供试品溶液,分别考察其在室温下放置10 h、反复冻融(-20 $^{\circ}\text{C}$ ~室温)3次、-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存45 d,考察ACV和ACV前体药物的稳定性,结果ACV和ACV前体药物在上述3种条件下放置后含量的RSD \leq 1.35%($n=6$),表明两者在上述条件下的稳定性较好。

2.4 ACV和ACV前体药物饱和溶解度的测定

配制一系列体积分数为10%~90%的丙二醇-水溶液。分别将过量的ACV或ACV前体药物加入至上述系列丙二醇-水溶液以及水(丙二醇体积分数为0)和丙二醇(丙二醇体积分数为100%)中,在32 $^{\circ}\text{C}$ 下搅拌30 h。将各混悬液以10 000 r/min离心15 min后,取上清液,用微孔滤膜(0.22 μm)滤过,续滤液用甲醇-水溶液(3:7, V/V)适当稀释(稀释倍数根据预实验确定,以保证测定结果在线性范围内为标准)后,分别按“2.3.1”项下条件进样测定,记录峰面积并代入线性方程,计算ACV和ACV前体药物的浓度,再根据各样品的稀释倍数计算其饱和溶解度。实验重复3次,结果见图1。

由图1可知,ACV在水和丙二醇中的饱和溶解度分别为(10.3 \pm 0.1)、(28.4 \pm 0.1) mmol/L,饱和溶解度曲线变化幅度不大;与ACV相比,ACV-Ace在不同体积分数丙二醇-水溶液中的饱和溶解度曲线变化较平缓。因此,ACV和ACV-Ace均不适合通过共溶剂法制备超饱和体系。ACV-But和ACV-Hex的饱和溶解度曲线随着丙二醇体积分数的增加出现了明显的上升趋势,二者在

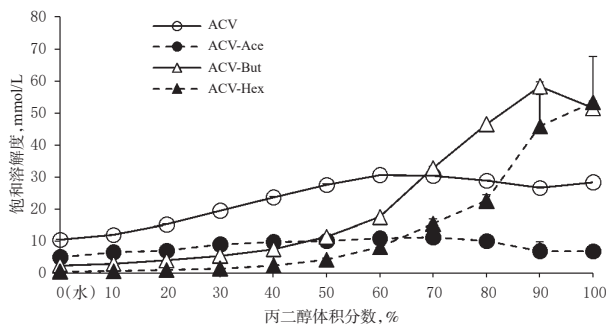


图1 ACV和3种ACV前体药物在不同体积分数丙二醇-水溶液中的饱和溶解度($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig 1 Saturated solubility of ACV and three ACV prodrugs in different volume fractions of propylene glycol-water solutions($\bar{x} \pm s, n=3$)

水中的饱和溶解度极低[(2.4 ± 0.1)、(0.5 ± 0.0)mmol/L],但在丙二醇中的饱和溶解度分别达到了(51.4 ± 2.1)、(53.4 ± 14.2) mmol/L。这提示ACV-But和ACV-Hex在不同体积分数丙二醇-水溶液中的饱和溶解度有较大差异,二者有可能通过共溶剂法制备超饱和体系。

2.5 ACV前体药物超饱和体系的构建

2.5.1 最大理论超饱和度的计算 本研究通过测定最大理论超饱和度(DS_{max})来评估各化合物在理论上能形成超饱和体系的最大潜力^[12]。分别将含ACV或ACV前体药物的丙二醇饱和溶液与水按照体积比1:9、2:8、……、9:1混合,计算其在混合瞬间所形成的理论浓度 α (α =丙二醇溶液中某化合物的摩尔量/与水混合后体系的总体积)。由于在特定混合比例下某化合物的实际溶解度(β)已通过“2.4”项下饱和溶解度实验予以测定,因此可通过下式计算各混合比例下的 DS_{max} : $DS_{max} = (\alpha - \beta) / \beta^{[12]}$ 。 DS_{max} 计算的示意图见图2。

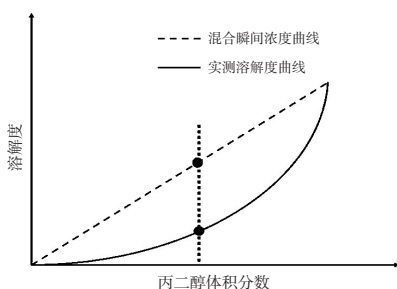


图2 DS_{max} 计算的示意图

Fig 2 Schematic diagram of DS_{max} calculation

分别按上述方法计算ACV及3种ACV前体药物的 DS_{max} ,并绘制ACV和ACV前体药物在不同体积分数丙二醇-水溶液中 DS_{max} 的变化曲线,详见图3。由图3可知,ACV和ACV-Ace的 DS_{max} 曲线均处于较低位置,且变化幅度较小;ACV-But和ACV-Hex的 DS_{max} 曲线变化明显,且随着丙二醇体积分数的增加,两者的 DS_{max} 均呈现出先升高后降低的趋势。当丙二醇体积分数介于20%~40%时,ACV-But的 DS_{max} 曲线处于较高位, DS_{max} 分别为 3.1 ± 0.2 、 3.3 ± 0.1 、 3.0 ± 0.2 (丙二醇体积分数分

别为20%、30%和40%)。当丙二醇体积分数介于10%~30%时,ACV-Hex的 DS_{max} 曲线处于较高位, DS_{max} 分别为 10.5 ± 3.2 、 12.3 ± 4.6 和 12.0 ± 3.4 (丙二醇体积分数分别为10%、20%和30%)。可见,4种化合物形成超饱和体系的潜力大小依次为ACV-Hex > ACV-But > ACV ≈ ACV-Ace。考虑到ACV-Hex形成超饱和体系的潜力最大,也就是实际能形成的DS[$DS = (\text{实际浓度} / \text{饱和溶解度}) \times 100\%$]的范围较宽,故本研究最终确定ACV-Hex为最优的超饱和体系候选前体药物,并对其进行进一步研究。

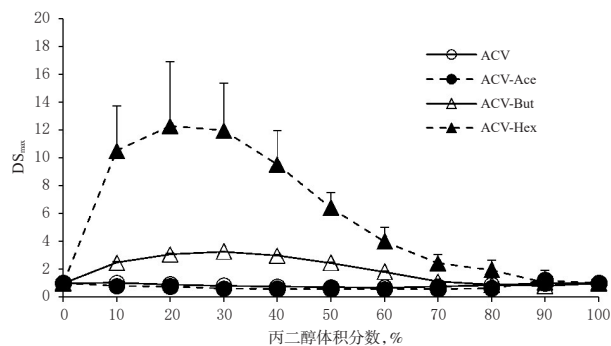


图3 ACV和3种ACV前体药物在不同体积分数丙二醇-水溶液中的 DS_{max} ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig 3 DS_{max} of ACV and three ACV prodrugs in different volume fractions of propylene glycol-water solutions($\bar{x} \pm s, n=3$)

2.5.2 ACV-Hex超饱和体系的构建 采用共溶剂法制备ACV-Hex超饱和体系。

(1)溶液体系的确定。由“2.4”“2.5.1”项下实验结果可知,当丙二醇体积分数为10%时,ACV-Hex的饱和溶解度为(0.56 ± 0.03) mmol/L、 $DS_{max} > 10$ 。由于在该条件下所用丙二醇的量较少,且形成的 DS_{max} 较高,因此本研究决定使用10%丙二醇-水溶液体系来制备ACV-Hex超饱和体系。

(2)抗成核高分子材料HPMC E3对ACV-Hex超饱和体系物理稳定性的影响。由于超饱和体系为热力学不稳定体系,故使用共溶剂法制备时,常需先在水相中加入一些抗成核高分子材料来抑制结晶形成^[11-12]。鉴于此,本研究在水相中加入1% (m/V)抗成核高分子材料HPMC E3,并考察其对具有不同DS的ACV-Hex溶液的成核抑制作用^[12]:精密称取ACV-Hex 1.29 g,置于100 mL量瓶中,加入10%丙二醇-水溶液溶解并定容,得浓度为40.0 mmol/L的ACV-Hex贮备液。取该贮备液适量,用10%丙二醇-水溶液逐级稀释,制成ACV-Hex浓度分别为2.8、5.6、11.2、16.9、22.5和28.0 mmol/L的系列溶液。取1 mL上述系列溶液(丙二醇的密度约为1.04 g/mL,与水接近),加入到9 mL含或者不含1%HPMC E3的水溶液中,混合均匀(混合后体积按10 mL计),即得系列ACV-Hex超饱和体系。在上述溶液混合瞬间,ACV-Hex的理论浓度分别为0.28、0.56、1.12、1.69、2.25和2.80

mmol/L, DS分别为0.5、1、2、3、4和5。将制备得到的系列超饱和体系迅速密封,于32℃水浴中静置1 h,然后在显微镜下观察,若在视野中出现清晰的棱角分明的晶体,则视为该溶液不稳定。结果,当DS为0.5和1时,添加或不添加HPMC E3的ACV-Hex超饱和体系在制备1 h后均澄清、透明;当 $DS \geq 2$ 且不添加HPMC E3时,ACV-Hex超饱和体系在制备1 h后均观察到有晶体出现。与之相比,添加HPMC E3且 $DS \leq 4$ 的所有ACV-Hex超饱和体系在制备1 h后仍保持澄清、透明,表明添加HPMC E3可以显著提高ACV-Hex超饱和体系的物理稳定性,在1 h内可有效抑制该超饱和体系的成核和结晶行为,从而得以维持体系内分子的热力学活度。当 $DS=5$ 时,在刚刚混合后即出现了白色沉淀,表明即便添加HPMC E3也不能有效维持处在这个DS下溶液的物理稳定性。这提示,在 $DS \leq 4$ 的ACV-Hex超饱和体系中,加入1% HPMC E3可以在一定时间内有效维持体系的物理稳定性,抑制ACV-Hex的快速沉淀。DS为4的ACV-Hex超饱和体系物理稳定性观察的显微图见图4。

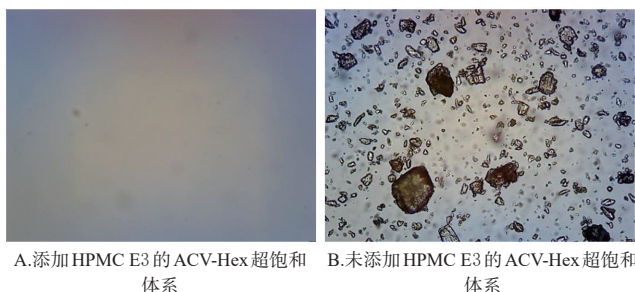


图4 DS为4的ACV-Hex超饱和体系物理稳定性观察的显微图($\times 10$)

Fig 4 Micrographs of physical stability observation of ACV-Hex supersaturated system with DS of 4 ($\times 10$)

2.6 ACV-Hex超饱和体系的被动透皮实验

使用新鲜猪皮和立式Franz扩散池进行透皮实验。用手术刀将新鲜猪耳外侧皮肤剥离,于-20℃冰箱中冷冻保存(保存时间不超过1个月),备用。实验前,将猪皮置于0.9%氯化钠溶液中解冻约10 min,以滤纸吸去多余水分,然后剃除猪毛,剪成直径约3 cm的圆形皮肤样本,再用真皮刀削去脂肪及部分真皮组织,最终得厚度约为1 mm的皮肤样本。将处理好的皮肤样本紧密固定在给药池和接收池之间,接收池中加入磷酸盐缓冲液(pH 7.4)10 mL,恒速(200 r/min)搅拌;接收池外水浴温度保持在32℃。给药池中加入0.9%氯化钠溶液1 mL,平衡20 min后移除,用水洗涤2次。按照“2.5.2(2)”项下方法分别制备添加或不添加HPMC E3的DS为0.5~4的ACV-Hex超饱和体系,并立即取各溶液0.5 mL分别加至给药池中,迅速用封口膜密封给药池并开始计时。此时,在给药池中的药物量分别为0.07(DS=0.5)、0.14

(DS=1)、0.28(DS=2)、0.42(DS=3)和0.56(DS=4) $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$ 。1 h后,从每个接收池中取样品溶液1 mL。拆除扩散池,将皮肤样品用水冲洗约1 min后,将其剪成小块(直径 < 3 mm),然后置于甲醇-水溶液(3:2, V/V)5 mL中,密封搅拌3 h以提取皮肤内部贮留的ACV和ACV-Hex。将上述皮肤提取液和取自接收池的样品溶液分别以15 000 r/min离心15 min,取上清液,用微孔滤膜(0.22 μm)滤过,收集滤液,以流动相适当稀释后(稀释倍数根据预实验确定,以保证测定结果在线性范围之内为标准),按“2.3.1”项下条件进样测定并计算ACV和ACV-Hex的浓度,将结果乘以各自样品的稀释倍数后,可得ACV和ACV-Hex在实际样品中的浓度。规定皮肤中ACV的贮留量(Q_{ACV})和皮肤中ACV-Hex的贮留量($Q_{\text{ACV-Hex}}$)之和为皮肤贮留总量(Q_{TOT})。实验重复6次。采用Excel 2007进行统计分析,具有相同DS的添加或不添加HPMC E3样品的皮肤贮留量比较采用Student's *t*检验,具有不同DS的添加或不添加HPMC E3样品的皮肤贮留量比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。结果见表1。

表1 不同DS的添加或不添加HPMC E3的ACV-Hex超饱和体系作用1 h后皮肤中 Q_{ACV} 、 $Q_{\text{ACV-Hex}}$ 和 Q_{TOT} 的测定结果($\bar{x} \pm s, n=6, \text{nmol}/\text{cm}^2$)

Tab 1 Determination results of Q_{ACV} , $Q_{\text{ACV-Hex}}$ and Q_{TOT} after the application of ACV-Hex supersaturated systems with different DS and with or without HPMC E3 for 1 h ($\bar{x} \pm s, n=6, \text{nmol}/\text{cm}^2$)

| DS | 不添加HPMC E3 | | | 添加HPMC E3 | | |
|-----|------------------|----------------------|------------------|-------------------|----------------------|-------------------|
| | Q_{ACV} | $Q_{\text{ACV-Hex}}$ | Q_{TOT} | Q_{ACV} | $Q_{\text{ACV-Hex}}$ | Q_{TOT} |
| 0.5 | 0.02 ± 0.01 | 0.09 ± 0.03 | 0.12 ± 0.03 | 0.01 ± 0.00 | 0.17 ± 0.09 | 0.18 ± 0.09 |
| 1 | 0.03 ± 0.01 | 0.24 ± 0.05 | 0.27 ± 0.06 | 0.13 ± 0.02 | 0.18 ± 0.08 | 0.27 ± 0.12 |
| 2 | 0.07 ± 0.02 | 0.25 ± 0.04 | 0.30 ± 0.03 | 0.03 ± 0.01 | 0.26 ± 0.15 | 0.30 ± 0.18 |
| 3 | 0.06 ± 0.02 | 0.35 ± 0.14 | 0.41 ± 0.14 | $0.31 \pm 0.19^*$ | $2.14 \pm 0.71^*$ | $2.55 \pm 0.64^*$ |
| 4 | 0.05 ± 0.02 | 0.59 ± 0.25 | 0.64 ± 0.25 | $0.20 \pm 0.07^*$ | $4.77 \pm 1.52^*$ | $4.90 \pm 1.58^*$ |

注:与具有相同DS但不添加HPMC E3的样品比较, * $P < 0.05$

Note: vs. sample with same DS but without HPMC E3, * $P < 0.05$

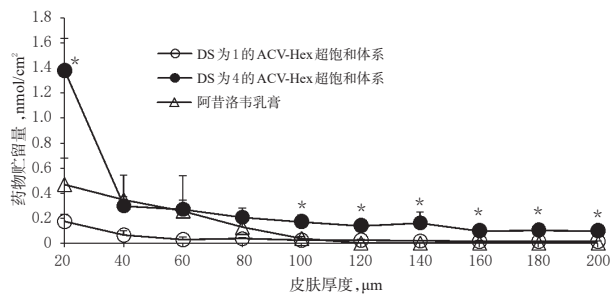
由表1可知,所有ACV-Hex超饱和体系进行被动透皮1 h后,接收池中均未检测到ACV-Hex或原型药物ACV,而在皮肤提取液样品中均检测到了ACV和ACV-Hex。在不添加HPMC E3的情况下,当DS为0.5时, Q_{TOT} 为 (0.12 ± 0.03) nmol/cm^2 ;当DS为1时, Q_{TOT} 增加至 (0.27 ± 0.06) nmol/cm^2 ;当DS为2、3、4时, Q_{TOT} 分别为 (0.30 ± 0.03) 、 (0.41 ± 0.14) 、 (0.64 ± 0.25) nmol/cm^2 ,组间比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。该结果表明,由于HPMC E3的缺失,导致超饱和体系中的ACV-Hex有结晶趋势,无法维持体系的高热力学活度,从而无法促进药物经皮吸收。在添加HPMC E3的情况下,DS为0.5、1、2时,ACV-Hex超饱和体系的 Q_{TOT} 分别为 (0.18 ± 0.09) 、 (0.27 ± 0.12) 、 (0.30 ± 0.18) nmol/cm^2 ;而当DS增至3和4时, Q_{TOT} 分别为 (2.55 ± 0.64) 、 (4.90 ± 1.58) nmol/cm^2 ,相比于同一DS下不添加HPMC E3样品

的 Q_{TOT} 均显著增加($P<0.05$)。由上述结果可知,添加 HPMC E3 的 ACV-Hex 超饱和体系的超饱和状态能在一定时间内得以维持,从而显著增加 ACV-Hex 的透皮递送量。

2.7 ACV-Hex 超饱和体系的皮肤分布实验

采用冷冻层切-分层定量法进行测定^[14]。同“2.6”项下超饱和体系透皮实验的浓度和操作方法,使用 DS 分别为 1、4 的添加了 HPMC E3 的 ACV-Hex 超饱和体系 (ACV-Hex 的剂量分别为 0.14、0.56 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$, 见“2.6”项)进行被动透皮实验;同时,以上市药物阿昔洛韦乳膏 (100 mg, 相当于 ACV 剂量 11.10 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$) 为阳性对照进行比较。1 h 后结束实验。将与药物直接接触的皮肤圆片剪下,用水冲洗约 1 min 后,拭干皮肤表面水分。将皮肤样品用 OCT 冰冻切片包埋剂固定于冷冻切片样品托上,浸入用液氮冷却的异戊烷中快速冷冻,取出后,以平行于皮肤表面的方式横向切片,连续得到单片厚度为 20 μm 的 10 个皮肤切片,依次保存,分别置于 1 mL 甲醇-水溶液 (3:2, V/V) 中提取 3 h,提取液以 15 000 r/min 离心 15 min,取上清液,用微孔滤膜 (0.22 μm) 滤过,收集续滤液,按“2.3.1”项下条件进样测定并分别计算续滤液中 ACV 和 ACV-Hex 的浓度。规定在第 1 个皮肤切片 (即厚度介于 0~20 μm 的皮肤组织) 中检测到的 ACV 和 ACV-Hex 的量分别为 Q'_{1-ACV} 和 $Q'_{1-ACV-Hex}$, 在第 2 个皮肤切片 (即厚度介于 20~40 μm 的皮肤组织) 中检测到的 ACV 和 ACV-Hex 的量分别为 Q'_{2-ACV} 和 $Q'_{2-ACV-Hex}$, 以此类推,直至 Q'_{10-ACV} 和 $Q'_{10-ACV-Hex}$; 规定第 1 个皮肤切片中药物贮留量 $Q'_1 = Q'_{1-ACV} + Q'_{1-ACV-Hex}$, 第 2 个皮肤切片中药物贮留量为 $Q'_2 = Q'_{2-ACV} + Q'_{2-ACV-Hex}$, 以此类推,直至 $Q'_{10} = Q'_{10-ACV} + Q'_{10-ACV-Hex}$; 规定 $Q'_{TOT-ACV} = Q'_{1-ACV} + Q'_{2-ACV} + \dots + Q'_{10-ACV}$, $Q'_{TOT-ACV-Hex} = Q'_{1-ACV-Hex} + Q'_{2-ACV-Hex} + \dots + Q'_{10-ACV-Hex}$; 规定 $Q'_{TOT} = Q'_{TOT-ACV} + Q'_{TOT-ACV-Hex}$ 。实验重复 3 次。采用 Excel 2007 进行统计分析,不同 ACV-Hex 饱和体系在相同厚度皮肤中的药物贮留量比较采用 Student's t 检验, $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。结果见图 5。

由图 5 可知,使用阿昔洛韦乳膏后,尽管在皮肤浅表处发现了较高浓度的 ACV [Q'_{1-ACV} 为 (0.47 ± 0.19) nmol/cm^2], 但在其后各层皮肤中 ACV 的量迅速下降,至第 5 层以后,已无法再检出 ACV。使用 DS 为 1 的 ACV-Hex 超饱和体系后,在第 5 层以后的各层皮肤中几乎无法检出药物,且其 $Q'_1 \sim Q'_4$ 也都显著低于阿昔洛韦乳膏 ($P<0.05$)。使用 DS 为 4 的 ACV-Hex 超饱和体系后,从皮肤厚度为 100 μm 开始 (即从 Q'_5 开始), 以后的每一层皮肤中检出的 ACV 和 ACV-Hex 量之和均显著高于阿昔洛韦乳膏在相同皮肤层中的 ACV 量 ($P<0.05$)。使用 DS 为 4 的 ACV-Hex 超饱和体系后,在皮肤基底表皮层 (厚度为 100~160 μm) 中的递送量 (即 $Q'_6 + Q'_7 + Q'_8$) 为 (0.40 ± 0.12) nmol/cm^2 , 其中 ACV (即 $Q'_{5-ACV} + Q'_{7-ACV} + Q'_{8-ACV}$) 的量为 (0.08 ± 0.03) nmol/cm^2 。



注:与阿昔洛韦乳膏比较, * $P<0.05$

Note: vs. aciclovir cream, * $P<0.05$

图 5 不同 DS 的 ACV-Hex 超饱和体系作用 1 h 后不同厚度皮肤中药物贮留量的测定结果 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig 5 Deposited amount of drug in different depths of skin after application of ACV-Hex supersaturated systems with different DS for 1 h ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3 讨论

促进 ACV 的透皮吸收,除了可以使用微乳、纳米粒等制剂方法外^[9,15],还可以将 ACV 制成水溶性的氨基酸酯前体药物,并利用离子导入将其递送至皮肤^[8]。超饱和体系的促渗机理在于提高了分子本身的热力学活度,而非像促渗剂那样改变了皮肤角质层属性^[16],因此其对皮肤的刺激性小;加之超饱和体系的构成和制备均较简单,故在实际操作中可能会比纳米粒制剂及离子导入装置等更简便易行。虽然超饱和体系在透皮给药领域的运用已有多年,但一直未见将该技术用于促进 ACV 透皮递送的研究报道。为此,本课题组进行了相关研究。

由于 HSV 的主要复制部位为皮肤基底表皮层,因此只知道药物在整体皮肤中的浓度还不够,还需通过皮肤分布实验来确定药物在基底表皮层的浓度。药物在皮肤中的生物利用度可采用胶带粘提法 (tape-stripping) 和微透析法 (microdialysis) 进行测定^[17-18]。但前者只能研究药物在角质层中的分布,而后者对透析装置的操作要求较为苛刻,且只能监测到药物在某个厚度皮肤组织中的吸收情况,无法反映药物在皮肤中分布的全貌。冷冻层切-分层定量法是将皮肤横切为数个切片,分别提取各切片中的药物,然后通过定量测定提取液中的药物含量,进而得知不同厚度皮肤中所蓄积的药物量,是一种行之有效的研究皮肤中药物分布的手段^[14]。

在本研究中,笔者首先基于饱和和溶解度数据,明确了 ACV-Hex 是制备超饱和体系的最佳前体药物,并确定了制备 ACV-Hex 超饱和体系的溶剂体系为 10% 丙二醇-水溶液。然后,通过加入一定量的抗成核高分子材料 HPMC E3,证实了其在短期内 (1 h) 可维持 DS 不超过 4 的 ACV-Hex 超饱和体系的物理稳定性。接着,笔者又通过超高效液相色谱串联质谱法确定了进入皮肤的药物量,证实了在 HPMC E3 的存在下,增加体系 DS 可以促进 ACV-Hex 的皮肤吸收。最后,笔者通过冷冻层切-分层定量法证实了 DS 为 4 的 ACV-Hex 超饱和体系能在不

同厚度皮肤层(特别是基底表皮层)中展现出较高的药物蓄积量,提示其在治疗皮肤局部HSV感染中可能具有一定的价值。另外,笔者还发现,在该体外透皮实验结束后,贮留在皮肤中的ACV-Hex量高于ACV量,说明仅有少部分的ACV-Hex进入皮肤后转化为ACV。如在分别使用DS为3、4的添加HPMC E3的超饱和体系后,递送进入皮肤中的ACV-Hex分别只有(12.2±7.3)%和(4.1±1.6)%转化为ACV,说明在1 h内的皮肤酶解是不完全的,笔者推测这可能是因为皮肤在处理和冷冻储存过程中酶活性有所降低。虽然如此,这些已经形成的ACV的量在理论上也足以抑制HSV感染:若假设ACV在厚度为100~160 μm的皮肤基底表皮组织中的分布均匀,则ACV在该组织中的理论浓度(不含未转化的ACV-Hex)为(13.33±5.01) nmol/cm³。经文献报道,ACV治疗HSV-1的半数抑制浓度为0.04~3.1 nmol/cm³[19],这远低于使用DS为4的ACV-Hex超饱和体系1 h后在皮肤基层中的ACV浓度。如考虑到在活体中,皮肤中酶的活力较体外更高,那么可以合理推测还将有相当一部分的ACV-Hex可在皮肤内部被快速酶解形成ACV,从而进一步增加ACV的局部浓度。由此可见,本研究所制的DS为4的添加了HPMC E3的ACV-Hex超饱和体系对局部治疗HSV皮肤感染可能具有一定价值。

综上所述,本研究通过合成ACV的脂溶性前体药物ACV-Hex并制备其超饱和体系,促进了ACV的透皮吸收,改善了ACV皮肤生物利用度低的问题。但本研究均在体外开展,尚未对ACV-Hex超饱和体系在活体动物皮肤上的应用效果进行评价,也未直接证实ACV-Hex超饱和体系对HSV感染的治疗效果,后续笔者将主要围绕上述两方面内容开展相关研究。

参考文献

[1] KLYSIK K, PIETRASZEK A, KAREWICZ A, et al. Acyclovir in the treatment of herpes viruses: a review[J]. *Curr Med Chem*, 2020, 27(24): 4118-4137.

[2] SAIFI Z, RIZWANULLAH M, MIR S R, et al. Bilosomes nanocarriers for improved oral bioavailability of acyclovir: a complete characterization through in vitro, ex-vivo and in vivo assessment[J]. *J Drug Deliv Sci Technol*, 2020, 57: 101634.

[3] ABLA N, NAIK A, GUY R H, et al. Topical iontophoresis of valaciclovir hydrochloride improves cutaneous acyclovir delivery[J]. *Pharm Res*, 2006, 23(8): 1842-1849.

[4] RAO S, ABZUG M J, CAROSONE-LINK P, et al. Intravenous acyclovir and renal dysfunction in children: a matched case control study[J]. *J Pediatr*, 2015, 166(6): 1462-1468.

[5] RICHELSEN R K B, JENSEN S B, NIELSEN H. Incidence and predictors of intravenous acyclovir-induced nephrotoxicity[J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2018, 37(10): 1965-1971.

[6] SPRUANCE S L, NETT R, MARBURY T, et al. Acyclovir cream for treatment of herpes simplex labialis: results of two randomized, double-blind, vehicle-controlled, multicenter clinical trials[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2002, 46(7): 2238-2243.

[7] ARNAL J, GONZALEZ-ALVAREZ I, BERMEJO M, et al. Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: aciclovir[J]. *J Pharm Sci*, 2008, 97(12): 5061-5073.

[8] CHEN Y, ALBERTI I, KALIA Y N. Topical iontophoretic delivery of ionizable, biolabile aciclovir prodrugs: a rational approach to improve cutaneous bioavailability[J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2016, 99: 103-113.

[9] SCHWARZ J C, KLANG V, KARALL S, et al. Optimisation of multiple W/O/W nanoemulsions for dermal delivery of aciclovir[J]. *Int J Pharm*, 2012, 435(1): 69-75.

[10] PIRET J, DESORMEAUX A, GOURDE P, et al. Efficacies of topical formulations of foscarnet and acyclovir and of 5-percent acyclovir ointment (zovirax) in a murine model of cutaneous herpes simplex virus type 1 infection[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2000, 44(1): 30-38.

[11] 边琼, 罗华菲, 张成豪, 等. 超饱和体系在经皮给药中的应用[J]. *中国医药工业杂志*, 2017, 48(3): 427-433.

[12] RAGHAVAN S L, TRIVIDIC A, DAVIS A F, et al. Crystallization of hydrocortisone acetate: influence of polymers[J]. *Int J Pharm*, 2001, 212(2): 213-221.

[13] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 四部[S]. 2020年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 466-472.

[14] QUARTIER J, CAPONY N, LAPTEVA M, et al. Cutaneous biodistribution: a high-resolution methodology to assess bioequivalence in topical skin delivery[J]. *Pharmaceutics*, 2019, 11(9): 484.

[15] BHUPINDER K, NEWTON M J. Acyclovir solid lipid nanoparticles for skin drug delivery: fabrication, characterization and in vitro study[J]. *Recent Pat Drug Deliv Formul*, 2017, 11(2): 132-146.

[16] CILURZO F, CASIRAGHI A, SELMIN F, et al. Supersaturation as a tool for skin penetration enhancement[J]. *Curr Pharm Des*, 2015, 21(20): 2733-2744.

[17] PENSADO A, CHIU W S, CORDERY S F, et al. Stratum corneum sampling to assess bioequivalence between topical acyclovir products[J]. *Pharm Res*, 2019, 36(12): 180.

[18] BODENLENZ M, TIFFNER K I, RAML R, et al. Open flow microperfusion as a dermal pharmacokinetic approach to evaluate topical bioequivalence[J]. *Clin Pharmacokinet*, 2017, 56(1): 91-98.

[19] BEAUCHAMP L M, ORR G F, MIRANDA P D, et al. Amino acid ester prodrugs of acyclovir[J]. *Antivir Chem Chemother*, 1992, 3(3): 157-164.

(收稿日期:2020-12-14 修回日期:2021-06-09)

(编辑:林静)