

盐酸哌甲酯的经皮渗透特性研究

俞 媛¹, 陈 琰¹, 张智艳², 高 申^{1*}, 丁雪鹰¹

(1. 第二军医大学药学院药剂学教研室, 上海 200433; 2. 长海医院药学部)

[摘要] 目的: 考察盐酸哌甲酯的体外经皮渗透特性。方法: 采用 Franz 扩散池, 裸鼠离体皮肤作为透皮模型, HPLC 法测定药物透皮浓度。计算药物在不同浓度(10~100 mg·ml⁻¹)条件下经皮渗透稳态流量、渗透系数以及透皮时滞, 并考察几种促透剂(氮酮、N-甲基-2-吡咯烷酮、丙二醇、油酸)对哌甲酯透皮行为的影响。结果: 盐酸哌甲酯的经皮渗透稳态流量随浓度增加显著增强($P < 0.01$), 浓度大于 50 mg·ml⁻¹ 时其渗透系数有所增加($P < 0.05$)。8% 氮酮和 5% 丙二醇对药物促透作用明显($P < 0.01$)。结论: 药物浓度、不同促透剂及其浓度对盐酸哌甲酯的经皮渗透有一定的影响。

[关键词] 盐酸哌甲酯; 透皮; 促透剂

[中图分类号] R 985 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2005)02-0189-03

Transdermal characteristics of methylphenidate hydrochloride

YU Yuan¹, CHEN Yan¹, ZHANG Zhi-yan², GAO Shen^{1*}, DING Xue-ying¹ (1. Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Department of Pharmacy, Changhai Hospital)

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the transdermal delivery characteristics of methylphenidate hydrochloride (MPH) *in vitro*. **Methods:** Characteristics of MPH crossing nude rats skin were studied with Franz diffusion cells. A high performance liquid chromatographic (HPLC) method was established to determine the concentration of MPH crossed the skin. The permeability coefficient (P), steady state flux (J) and lag time(LT) for MPH through the skin of nude rats treated with various enhancers were compared with those of control. **Results:** The permeability coefficient increased with the increase of MPH concentration. The penetration of MPH through nude rats skin was obviously enhanced by 8% Azone and 5% propylene glycol ($P < 0.01$). **Conclusion:** Transdermal absorption of MPH can be affected by the concentration of drug and various penetration enhancers.

[KEY WORDS] methylphenidate hydrochloride; transdermal delivery; penetration enhancer

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2005, 26(2): 189-191]

盐酸哌甲酯(methylphenidate hydrochloride, MPH)是注意缺陷多动障碍(attention-deficit/hyperactivity disorder, ADHD)的一线治疗药物,其口服生物利用度较低(30%),半衰期短,每日需给药2~3次^[1]。

针对 MPH 的作用特点和应用于儿童这个特殊群体的需要,我们认为透皮贴剂可作为其比较理想的给药剂型,在维持有效治疗作用、避免首过效应、减少给药次数、加强患者用药顺应性等方面起到积极的作用^[2]。本文对 MPH 的基础透皮特性进行研究,并筛选合理的透皮促进剂,以作为其经皮治疗给药系统的研究基础。

1 材料和方法

1.1 仪器和试剂 TK-12A 型 Franz 透皮扩散仪(上海锴凯科技贸易有限公司);高效液相色谱系统(美国 Waters 公司);Cary 100 紫外分光光度计(美国 Varian 公司);81-2 型恒温磁力搅拌器(上海志威

电器有限公司);盐酸哌甲酯原料(苏州医药集团有限公司,批号:970801);月桂氮草酮(氮酮, Azone, 北京耐确生化研究所,批号:020711);N-甲基-2-吡咯烷酮(NMP,上海化学试剂公司进口分装,批号:980420);1,2-丙二醇(PG,上海化学试剂公司,批号:001028);油酸(OA,上海化学试剂公司,批号:020520);甲醇、乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯;裸鼠(中国科学院上海实验动物中心)。

1.2 透皮实验方法^[3,4] 裸鼠(雄性,约8周龄),拉颈处死后立即剥离背部皮肤,小心剔除皮下脂肪,用生理盐水清洗,拭干备用。采用 Franz 透皮实验扩散仪,扩散介质为 pH 6.8 磷酸盐缓冲液(PBS),将皮肤平整置于扩散池的结合部,角质层面向供给池,真皮层面向接受池,恒温 37℃,接受池内为 pH 6.8

[基金项目] 上海-SK 研究与发展基金(2004011-h)。

[作者简介] 俞 媛(1978-),女(汉族),博士。

* Corresponding author. E-mail: liullk@online.sh.cn

PBS,使用前超声脱气。供给池内加入以 pH 6.8 PBS 配制的不同浓度 MPH 溶液,以及药物与促透剂 Azone、NMP、PG、OA 的混合溶液。考察药物浓度及几种不同浓度促透剂对药物的稳态流量(J)、渗透系数(P_c)、增渗比(ER)及时滞(LT)的影响。搅拌子搅速为 300 r/min,于 0~48 h 内分不同时间点取样,每次从接受池内取样 1 ml,并补充等温介质 1 ml。将样品中加入 1 ml 乙腈,漩涡混合,高速(15 000 r/min)离心 10 min,取上清液 HPLC 法测定浓度,计算校正浓度,并计算透皮参数。

1.3 HPLC 法^[5] 色谱柱: Hypersil C18 柱(4.6 mm×150 mm, 5 μ m);流动相: 甲醇-0.01 mol/L 醋酸钠溶液-0.01 mol/L 冰醋酸(70:25:5);检测波长: 210 nm;流速: 0.8 ml/min;进样量: 20 μ l。

1.4 统计学处理 采用 Microsoft Excel 软件进行双侧 *t* 检验。

2 结果

2.1 MPH 的典型色谱图 MPH 的保留时间为 5.8~6.0 min,色谱图见图 1。

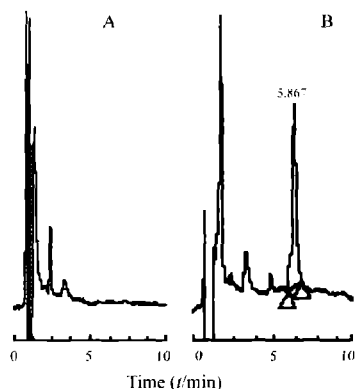


图 1 盐酸哌甲酯透皮浓度测定典型色谱图
Fig 1 Typical chromatogram of methylphenidate hydrochloride *in vitro* percutaneous test

A: Blank; B: MPH sample

2.2 标准曲线 以透皮溶液(空白皮肤透过液:乙腈=1:1)配制系列浓度的 MPH 溶液,采用 HPLC 法进行测定。外标法以 MPH 浓度 $c(\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1})$ 对峰面积 *A* 进行线性回归,标准曲线方程为: $A = 38.64 \times 10^3 c - 22.88 \times 10^3 (r = 0.999)$ 。线性范围: 0.5~500 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$,信噪比 $S/N = 3$ 时最低检测限为 20 ng。方法回收率为 97.31%,日内精密密度为 1.11%($n = 5$),日间精密密度为 0.87%($n = 5$)。

2.3 浓度对 MPH 透皮行为的影响 随着浓度提高,MPH 透皮稳态流量增加,几种浓度药物透皮时滞无显著差异。结果见表 1。

表 1 不同浓度盐酸哌甲酯的经皮渗透参数测定结果
Tab 1 Percutaneous parameters of MPH across nude rats skin from different concentration solution

($n = 5, \bar{x} \pm s$)

MPH ($\mu\text{g}/\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$)	Permeability coefficient ($\text{cm} \cdot \text{h}^{-1}$)	Penetration flux ($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$)	Lag time (t/h)
10	$(0.58 \pm 0.23) \times 10^{-3}$	5.77 ± 2.39	0.09 ± 0.07
30	$(0.40 \pm 0.17) \times 10^{-3}$	11.91 ± 5.09	0.41 ± 0.25
50	$(0.35 \pm 0.07) \times 10^{-3}$	17.49 ± 3.96	0.77 ± 0.28
80	$(0.52 \pm 0.10) \times 10^{-3}$	41.95 ± 8.32	0.33 ± 0.26
100	$(0.58 \pm 0.08) \times 10^{-3}$	58.19 ± 7.74	0.58 ± 0.35

2. 促透剂对 MPH 透皮行为的影响 一定浓度的氮酮和 PG 对药物透皮有显著增强作用(表 2)。

表 2 不同促透剂对哌甲酯透皮的影响
Tab 2 Percutaneous effect of MPH across nude rats skin with different penetration enhancer

($n = 5$)

Penetration enhancer	Permeability coefficient ($\text{cm} \cdot \text{h}^{-1}$)	Enhancement ratio	Lag time (t/h)
None	$(0.35 \pm 0.07) \times 10^{-3}$	1.00	0.77 ± 0.28
5% Azone	$(0.84 \pm 0.10) \times 10^{-3}$	2.40	2.22 ± 0.88
8% Azone	$(1.47 \pm 0.25) \times 10^{-3}$	4.20	1.60 ± 0.36
5% NMP	$(0.70 \pm 0.15) \times 10^{-3}$	2.00	1.37 ± 0.27
8% NMP	$(1.03 \pm 0.27) \times 10^{-3}$	2.94	2.36 ± 0.69
2% PG	$(1.00 \pm 0.15) \times 10^{-3}$	2.85	1.84 ± 0.96
3% PG	$(1.65 \pm 0.46) \times 10^{-3}$	4.71	2.38 ± 0.51
5% PG	$(2.16 \pm 0.40) \times 10^{-3}$	6.17	1.79 ± 0.78
3% OA	$(0.85 \pm 0.20) \times 10^{-3}$	2.42	4.63 ± 1.10
5% PG + 3% Azone	$(0.98 \pm 0.17) \times 10^{-3}$	2.80	1.83 ± 0.52
5% PG + 5% Azone	$(0.41 \pm 0.15) \times 10^{-3}$	1.17	3.21 ± 0.68

3 讨论

取 MPH 对照品适量,溶于 pH 6.8 PBS 中,进行紫外扫描,在 210 nm 处有一最大吸收,为了排除皮肤蛋白的干扰,采用 HPLC 法测定药物透皮吸收浓度。

一定的浓度梯度会使药物透皮能力增强,在高浓度的供给介质作用下药物在一定时间内的经皮渗透往往会加强,但是这也由药物的具体性质而定,一些溶解度小的药物表现并不明显。实验发现,MPH 的药物

浓度 $<50\text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ 时对其透皮时滞并无显著影响($P>0.05$),而随着浓度增加($\geq 50\text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$),MPH渗透系数有一定的提高($P<0.05$),浓度 $50\text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ 时其渗透系数 P 较低,我们推测这可能与药物在皮肤内产生蓄积,而此时的浓度梯度对其渗透作用影响作用较小有关。浓度的增加对 MPH 稳态流量有显著促进作用($P<0.01$)。

现在研究应用较多的促透剂主要有:萜类、精油及内酯、吡咯烷酮类、磷脂及磷酸盐类、有机酸及酯类和酰胺类等。透皮吸收促进剂种类不同,其作用机制和效果也不同,Barry^[4]提出的脂质-蛋白分配理论被广泛接受,这一理论认为促透剂的促透机制为:增加了药物,共渗透促进剂,共溶剂分配进入角质层,破坏高度有序的角质层结构,增加角质层流动性,从而促进药物渗透。临床用药中 MPH 每日剂量一般不超过 50 mg ,在此基础上本文考察了促透剂对 MPH 的透皮影响,发现 8% Azone 与 5% PG 可显著促进药物透皮吸收。随着促透剂开发品种的增多及有关研究的延伸,有研究按一定比例配成的多元促透剂较单一促透剂可以达到更好的促透效果,但前者并非都比后者好,主要与促透剂的剂量组合、被透药物本身理化性质等有关。有文献报道

PG 与 Azone 联合使用对药物的透皮有一定的促进作用,但与药物性质和两种促透剂的比例有很大关系,我们发现 5% PG+ 3% Azone 对 MPH 促透作用明显($P<0.05$),对透皮时滞无显著影响($P>0.05$),但是其增渗比小于 8% Azone,推测与 PG 增加了 MPH 在 Azone 中的溶解度从而阻止药物向皮肤角质层扩散有关。

[参考文献]

- [1] Weber P, Lüttsch J. Methylphenidate treatment[J]. *Pediatr Neurol*, 2002, 26(4): 261-266.
 - [2] Panchagnula R. Transdermal delivery of drugs[J]. *Indian J Pharmacol*, 1997, 29(2): 140-156.
 - [3] Fang JY, Hwang TL, Fang CL, et al. *In vitro* and *in vivo* evaluations of the efficacy and safety of skin permeation enhancers using flurbiprofen as a model drug [J]. *Int J Pharm*, 2003, 255(5): 153-166
 - [4] Barry BW. Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2001, 14(2): 101-114
 - [5] Singh P, Boniello S, Liu P, et al. Transdermal iontophoretic delivery of methylphenidate HCl *in vitro* [J]. *Int J Pharm*, 1999, 178(3): 121-128.
- [收稿日期] 2004-09-21 [修回日期] 2004-11-29
[本文编辑] 尹茶

Epitope DNA vaccines against tuberculosis: spacers and ubiquitin modulates cellular immune responses elicited by epitope DNA vaccine

Wang QM, Sun SH, Hu ZL, Zhou FJ, Yin M, Xiao CJ, Zhang JC (Department of Medical Genetics, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] Cell-mediated immune responses are crucial in the protection against tuberculosis. In this study, we constructed epitope DNA vaccines (p3-M-38) encoding cytotoxic T lymphocyte (CTL) epitopes of MPT64 and 38 kDa proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. In order to observe the influence of spacer sequence (Ala-Ala-Tyr) or ubiquitin (UbGR) on the efficacy of the two CTL epitopes, we also constructed DNA vaccines, p3-M-S(spacer)-38, p3-Ub (UbGR)-M-S-38 and p3-Ub-M-38. The immune responses elicited by the four DNA vaccines were tested in C57BL/6 (H-2^b) mice. The cytotoxicity of T cells was detected by LDH-release method and by enzyme-linked immunospot assay for epitope-specific cells secreting interferon-gamma. The results showed that DNA immunization with p3-M-38 vaccine could induce epitope-specific CD8⁺ CTL response and that the spacer sequence (AAY) only enhanced M epitope presentation. The protein-targeting sequence (UbGR) enhanced the immunogenicity of the two epitopes. The finding that defined spacer sequences at C-terminus and protein-targeting degradation modulated the immune response of epitope string DNA vaccines will be of importance for the further development of multi-epitope DNA vaccines against tuberculosis.

[*Scand J Immunol*, 2004, 60(3): 219-225]