

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.00465

负极性驻极体对美洛昔康贴剂透皮吸收的促渗作用

程亮¹, 梁媛媛¹, 孔玉秀², 宋茂海¹, 崔黎丽², 江键^{1*}

1. 第二军医大学基础部数学教研室, 上海 200433

2. 第二军医大学药学院无机化学教研室, 上海 200433

[摘要] **目的:**检测SD大鼠经皮给予美洛昔康4 h内的血药浓度和给药面皮肤浸出液中的浓度,以及荧光素钠(NaFI)在SD大鼠完整皮肤中的定位和荧光强度,探讨负极性驻极体对美洛昔康透皮的促渗作用以及驻极体促渗的主要途径。**方法:**利用药剂学方法和栅控恒压电晕充电技术制备驻极体美洛昔康贴剂;采用高效液相色谱法检测美洛昔康的浓度;以NaFI为探针,通过激光扫描共聚焦显微镜(LSCM)考察其在皮肤中的定位及透皮路径情况。**结果:**(1)负极性驻极体及其驻极体美洛昔康贴剂具有良好的电荷储存稳定性;(2)高效液相色谱检测表明经皮给药4 h内驻极体对美洛昔康的透皮促进作用明显;(3)LSCM研究结果进一步验证了驻极体对小分子的促渗作用,同时证实了驻极体促进药物透皮的主要途径是角质层间脂和毛囊孔扩散。**结论:**负极性驻极体可以作为美洛昔康透皮吸收的一个促进因子。

[关键词] 驻极体;美洛昔康;皮肤给药;高压液相色谱法;激光扫描共聚焦显微镜;聚丙烯

[中图分类号] R 943.43 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2009)05-0465-04

Enhancing effect of negative electret on percutaneous drug absorption of meloxicam patch in SD rats

CHENG Liang¹, LIANG Yuan-yuan¹, KONG Yu-xiu², SONG Mao-hai¹, CUI Li-li², JIANG Jian^{1*}

1. Department of Physics and Mathematics, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

2. Department of Inorganic Chemistry, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433

[ABSTRACT] **Objective:** To determine meloxicam concentrations in both plasma and extract solution of tested-skin in SD rats and the fluorescence intensity, location of fluorescein sodium salt (NaFI) in striped rat skin within 4 h after transdermal administration, so as to investigate the enhancing effect of negative electret on percutaneous absorption of meloxicam and percutaneous absorption route of NaFI. **Methods:** Pharmaceutical method and grid-controlled constant corona charge technique were used to prepare electret meloxicam patch. High performance liquid chromatography (HPLC) method was employed to determine meloxicam concentration after transdermal administration, NaFI was used as probe to determine the localization and percutaneous absorption route of NaFI by using laser scanning confocal microscopy (LSCM). **Results:** (1) Negative electret and its polypropylene (PP) electret meloxicam patch exhibited a good charge storage stability. (2) The results of HPLC demonstrated that electret had a remarkable enhancing effect on percutaneous absorption of meloxicam after application for 1-4 h. (3) LSCM further proved the enhancing effect of negative electret on percutaneous absorption of small molecules. We also found that the stratum corneum and the hair follicle areas were the two main pathways for the enhancing effect of the electret. **Conclusion:** Negative electret can be used as an enhancer for transdermal permeation of meloxicam.

[KEY WORDS] electret; meloxicam; cutaneous administration; high pressure liquid chromatography; laser scanning confocal microscopy; polypropylene

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(5): 465-468]

美洛昔康是一种新型的非类固醇抗炎药物(NSAIDs),通过选择性地抑制环氧酶-2(COX-2)而阻止致炎的前列腺素(prostaglandins, PGs)的合成,

具有较强的镇痛消炎作用。该药对骨关节炎、类风湿性关节炎和坐骨神经痛有较好的治疗效果^[1],胃肠道反应较其他非类固醇抗炎药物小,但有关口服

[收稿日期] 2008-10-07 **[接受日期]** 2009-03-31

[基金项目] 国家自然科学基金(50577066);军队“十一五”国际合作项目(06H022)。Supported by National Natural Science Foundation of China(50577066) and International Cooperation Project of “11th Five-Year Plan” of PLA(06H022).

[作者简介] 程亮,硕士生, E-mail: vachengliang@yahoo.com.cn

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-81870921, E-mail: jjiang@smmu.edu.cn

和静脉用药的不良反应也有报道^[2-4]。经皮给药可以避免口服和静脉用药引起的血药浓度过高所造成的毒副作用,具有避免肝胃肠的首过效应、减少胃肠刺激、维持恒定的血药浓度等诸多优点,已逐渐成为医药学研究的热点之一。因皮肤的屏障作用,许多药物经皮给药后,通透速率和透皮量达不到治疗要求,因此,寻找促进药物透过皮肤的方法已成为研发透皮给药系统的关键。

驻极体是能够长期储存空间电荷和偶极电荷的电介质材料。作为一种新的物理促渗因子,驻极体产生的高压静电场和微电流可以改变皮肤结构和驻极态^[5],起到促进药物透皮的作用。本课题组自1998年开展对抗炎药物透皮吸收的促渗作用的体外透皮实验以来,已经取得了较为满意的成果^[5-9],但是体内实验部分相对缺乏。本研究通过检测SD大鼠经皮给药4h内美洛昔康在给药面局部的浓度变化,并借助共聚焦显微镜分析荧光素钠(fluorescein sodium salt, NaFI)透皮路径,为驻极体透皮给药剂的研制提供实验数据。

1 材料和方法

1.1 试剂及器材 美洛昔康原料药(上海康明高科技有限公司);NaFI(美国Sigma公司);冰乙酸,优级纯(国药集团化学试剂上海有限公司);乙腈,色谱纯(天津市永大化学试剂开发中心);甲醇,色谱纯(美国默克公司);4%多聚甲醛由实验室自制。栅控电晕充电系统(大连理工大学静电与特种电研究所),SD803表面电位计(机械电子部上海电动工具厂),氮气吹扫仪(杭州奥盛仪器有限公司),Agilent-1100高效液相色谱仪(美国安捷伦科技有限公司),Leica TSC SP2激光扫描共聚焦显微镜(德国莱卡公司)。

1.2 材料及实验动物 聚丙烯(polypropylene, PP, 日本东丽株式会社);多孔聚四氟乙烯(porous polytetrafluoroethylene, porous PTFE, 上海塑料研究所);美洛昔康贴剂(1 mg/cm², 第二军医大学药学院无机化学教研室提供);SD大鼠,雄性,体质量(210±10)g,由第二军医大学实验动物中心提供。

1.3 驻极体美洛昔康贴剂的制备 用栅控电晕充电系统制备-500 V多孔PTFE驻极体(用于NaFI透皮的研究)和-1 200 V PP驻极体(用于驻极体美洛昔康贴剂的制备),用表面电位测量系统检测其电位随时间变化的情况。将PP驻极体充电面与美洛昔康贴剂背垫层复合制成驻极体美洛昔康贴剂。

1.4 HPLC定量分析给药面皮肤中的美洛昔康

1.4.1 色谱条件 色谱柱:Zorbax Eclipse XDB-

C₁₈(4.6 mm×150 mm, 5 μm);流动相:A相为冰乙酸-水(2:98, V/V), B相为冰乙酸-甲醇(2:98, V/V), A:B=30:70(V/V);检测波长:355 nm^[10];流速:1 ml/min;柱温:40℃。

1.4.2 工作曲线及方法学研究 取健康雄性SD大鼠,麻醉后腹部去毛,眼眶静脉取血于肝素化试管,1 500×g离心10 min得空白血浆;剥离皮肤剪碎后加入0.1 mol/L的NaOH溶液(1:10),浸泡24 h,1 500×g离心10 min得皮肤浸出液。

样品制备:取血浆0.5 ml,加乙腈0.6 ml,涡旋2 min;皮肤浸出液0.5 ml,加0.5 ml乙腈,涡旋30 s。上述两类样品分别1 500×g离心15 min,取上清0.8 ml室温下氮气吹干。残留物用100 μl流动相溶解,10 000×g超速离心10 min,上清10 μl进样。

标准曲线制备:取空白血浆0.5 ml 8份,分别加适量的美洛昔康标准品溶液稀释成0.05、0.096、0.192、0.403、0.960、1.919、4.031、9.597 μg/ml的标准系列血浆样品;取皮肤浸出液0.5 ml 7份稀释成0.247、0.494、1.046、1.996、3.992、4.943、9.981 μg/ml的标准系列皮肤浸出液样品。各按前述样品制备方法处理,记录色谱图,利用最小二乘法以样品浓度(C)对峰面积(A)作线性回归。

精密度与提取回收率^[11]测定:按上述方法配制高、中、低3个不同浓度的美洛昔康质控样品,各质控样品日内重复测定5次,并连续测定5 d,测得的色谱峰面积代入标准曲线计算测定值,用标准偏差与测定平均值相比计算日内、日间精密度;另取等量的相同3个浓度的标准溶液,用流动相稀释至相同体积,不经提取处理直接测定,用质控样品的色谱峰面积与未经制备处理的相应浓度的标准溶液的色谱峰面积比较计算提取回收率。

1.4.3 透皮实验 取SD大鼠24只,随机分成3个取样组(1 h, 2 h, 4 h)。每组8只,按体质量大小配对,每对经麻醉、固定、腹部去毛后分别贴上美洛昔康贴剂(背垫层上贴PP膜)和驻极体美洛昔康贴剂。给药后分别于1、2、4 h取1个取样组大鼠除去贴剂,眼眶静脉取血于肝素化试管,1 500×g离心10 min取上清血浆0.5 ml;擦净皮肤,取给药部位皮肤0.5 g,剪碎后加入0.1 mol/L NaOH溶液5 ml,浸泡过夜,1 500×g离心10 min取上清0.5 ml。血浆与皮肤浸出液按前述样品制备方法处理用于HPLC分析。

1.5 NaFI在皮肤中的定位及变化 SD大鼠麻醉后腹部去毛,以腹中线分为左右对称两部分,每部分再划分出2 cm×2 cm条带实验区域各2个并涂以0.125%NaFI(荧光探针)溶液0.3 ml,轻轻涂抹使其

分布均匀。待干后,大鼠腹部左侧从头至尾的2个条带分别敷以多孔PTFE驻极体和非注极的多孔PTFE薄膜作为驻极体贴剂的实验组和对照组。大鼠腹部右侧实验方法同左侧。经过0.5 h、2 h、3 h、6 h后迅速剪取实验区皮肤,PBS冲净表面残留药物,经固定、脱水、石蜡包埋处理,切片做激光扫描共聚焦显微(LSCM)观察。

2 结果

2.1 驻极体的电位变化 图1中可见,多孔PTFE和PP驻极体常温下存放4 h表面电位保持初始值的99.59%和88.97%,存放144 h分别仅衰减8.45%和25.22%,表明负极性多孔PTFE和PP驻极体具有优异的电荷储存稳定性。驻极体美洛昔康贴剂的表面电位归一化在数值上与PP驻极体基本一致,呈指数衰减,4 h内表面电位能保持其初始电位的94.30%,存放144 h依旧保持77.30%。

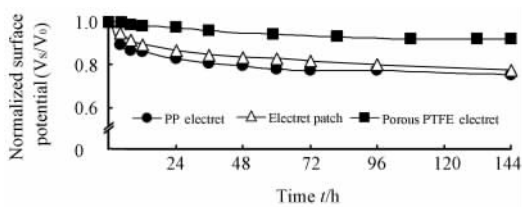


图1 常温常湿条件下驻极体的表面电位衰减曲线
Fig 1 Potential decay on negative electret surface at normal temperature and normal humidity

2.2 给药面皮肤浸出液中美洛昔康的浓度

2.2.1 专属性 在本实验色谱条件下,美洛昔康的保留时间在3.4 min左右,药峰峰形对称,空白血浆和空白皮肤浸出液对其均无干扰。

2.2.2 标准曲线 美洛昔康的皮肤浸出液浓度为0.25~10 μg/ml,血药浓度为0.05~10 μg/ml,与样品峰面积均呈良好相关性,回归方程分别为: $C_1 = 0.01192 A_1 - 0.01048, r = 0.99994, P < 0.0001$; $C_2 = 0.01444 A_2 + 0.01072, r = 0.99986, P < 0.0001$ 。

HPLC方法测皮肤浸出液中美洛昔康浓度具有较好的提取回收率(83.87%~97.59%),日内RSD<8%,日间RSD<6%;血药浓度检测方法提取回收率为74.69%~82.38%,日内RSD<4%,日间RSD<12%。

2.2.3 药-时曲线 用上述HPLC方法测量经皮给药4 h内SD大鼠给药面皮肤浸出液中美洛昔康的药-时曲线见图2A,血药浓度-时间数据见图2B。

结果显示:经皮给药4 h内,驻极体美洛昔康贴

剂组皮肤浸出液中美洛昔康的浓度要高于美洛昔康贴剂组,血药浓度也表现出类似的变化。此外,在研究时间范围内,两组美洛昔康浓度的变化都呈上升趋势,无论是美洛昔康在皮肤浸出液的浓度还是血药浓度都表现出负极性驻极体对其经皮促渗的作用。

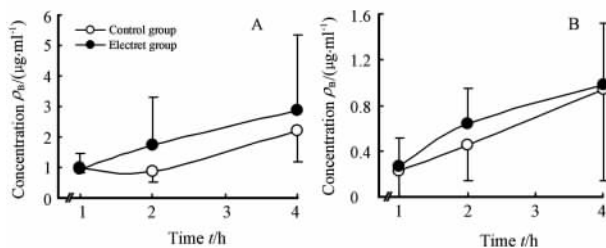


图2 给药面皮肤浸出液(A)和血浆(B)中美洛昔康的平均药-时曲线

Fig 2 Mean concentration-time curves of meloxicam in skin extract solution (A) and plasma (B) of rats
 $n = 4, \bar{x} \pm s$

2.3 NaFI在皮肤中的荧光强度变化 为了进一步研究驻极体促进小分子物质经皮渗透的途径及机制,我们以NaFI为探针替代美洛昔康,通过共聚焦显微镜的定性和定量分析不同时间NaFI的分布及强度。在共聚焦图像中荧光的位置可以直观地反映荧光探针的分布,荧光强度代表NaFI的含量,其强弱可用荧光强度值(0~255)来表示以实现量化。图3A为多孔PTFE薄膜组NaFI透皮2 h的典型皮肤激光扫描共聚焦图像,图3B是-500 V驻极体实验组的结果。角质层和毛囊孔的荧光强度经归一化处理其时间变化曲线分别如图4A和图4B所示。

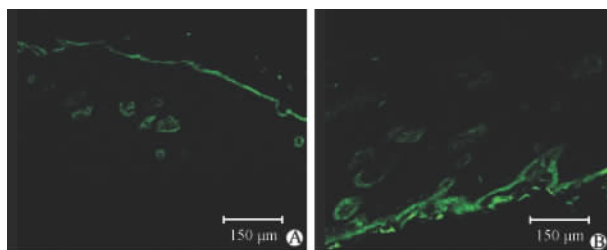


图3 NaFI透皮2 h的典型皮肤激光扫描共聚焦显微图像

Fig 3 Representative LSCM images of NaFI after 2 h transdermal administration

A: Skin treated by porous PTFE (2 h); B: Skin treated by porous PTFE electret (2 h)

结果显示:在2 h时实验组鼠皮角质层的荧光强度(图3B)要比相同部位的对照组(图3A)强,在6 h内角质层中的荧光强度值也一直高于对照组(图4A)。在鼠皮毛囊孔处也得到了相似的结果(图3A、

3B,4B)。与用 HPLC 法检测皮肤中美洛昔康浓度的实验结果趋势上基本一致,进一步证实负极性驻极体的经皮促渗作用。图 3A、3B 上进一步可见 NaFI 主要集中在鼠皮角质层和毛囊孔处,提示驻极体药物促渗的途径主要是角质层和毛囊孔。另外实验组 NaFI 的透皮深度都比对照组深,而且实验组(图 3B)角质层疏松,增厚,毛囊孔外径拓宽,推测是驻极体引起角质层细胞间结构疏松,细胞间隙增大,从而促进药物的渗透。

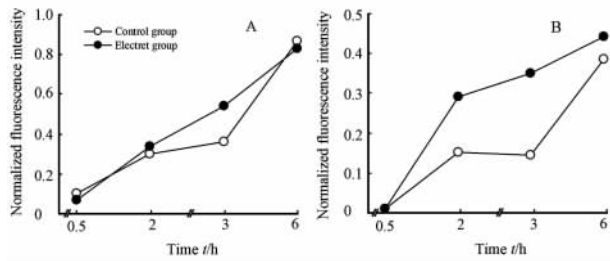


图 4 荧光强度变化曲线

Fig 4 Profile of fluorescence intensity

A: Stratum coreum; B: Hair follicle

3 讨论

PP 膜突出的疏水性使得利用电晕充电沉积在样品表面和近表面的电荷层即使在相对湿度差异较大的环境中也能维持几乎完全相同的电荷稳定性^[12]。因此,负极性 PP 驻极体可以用于驻极体透皮贴剂的制备并作为药物经皮吸收的促渗源。

美洛昔康为烯醇酸 NSAIDs,在水中的溶解度很低,且具有 pH 依赖性,在 pH=4.0 时最低,随 pH 的升高而升高。本实验先用 0.1 mol/L 的 NaOH 配置较高浓度的美洛昔康标准品溶液,再用空白血浆或皮肤浸出液稀释至所需浓度,以排除内源性物质对分析的影响^[11]。本实验建立的美洛昔康皮肤浸出液和血药浓度的 HPLC 测定法,无内源性杂质的干扰,精密度、提取回收率完全满足生物样品的分析要求^[11]。

在经皮给药 4 h 内,驻极体贴剂组美洛昔康无论是皮肤局部滞留量(皮肤浸出液浓度)还是透皮量(血药浓度)都较对照组多,显示出负极性驻极体对美洛昔康透皮的良好促渗作用,但实验中使用的样本量相对较少($n=4$),动物的个体差异又很大,加上美洛昔康在体内的代谢使得对照组和实验组在各时间点上的差别不明显($P>0.05$)。共聚焦显微镜的定性和定量分析结果显示:与对照组相比,负极性驻极体可改变鼠皮显微结构促进 NaFI 经皮吸收,促渗主要途径为角质层和毛囊孔。多孔 PTFE 驻极体注

极面直接接触皮肤,没有驻极体贴剂中离子型基质、离子型药物以及贴剂厚度对电位的影响和贴剂覆盖导致的皮肤水化对电位的屏蔽作用,而且多孔 PTFE 驻极体储电层在常温下电荷自然衰减速度比 PP 驻极体慢,考虑作用于鼠皮上的电位等效性,实验选用多孔 PTFE 的注极电压要比 PP 电压低。

驻极体具有良好的电荷储存能力,能够提供稳定的静电场作用于皮肤及制剂药物,改变皮肤的结构^[5],促进美洛昔康的经皮吸收。本实验为驻极体美洛昔康贴剂透皮的体内研究提供了初步依据及方法学上的参考。

[参考文献]

- [1] Engelhardt G. Pharmacology of meloxicam, a new non-steroidal anti-inflammatory drug with an improved safety profile through preferential inhibition of COX-2[J]. Br J Rheumatol, 1996, 35 (Suppl 1):4-12.
- [2] 马昭霞. 美洛昔康致过敏性休克及抢救 1 例[J]. 中国社区医师:综合版, 2005, 7:31.
- [3] 薛 竞. 美洛昔康致重症药疹、类白血病反应及肝炎[J]. 药物不良反应杂志, 2007, 9:90.
- [4] Bjarnason I. Forthcoming non-steroidal anti-inflammatory drugs: are they really devoid of side effects[J]? Ital J Gastroenterol Hepatol, 1999, 31(Suppl 1):S27-S36.
- [5] 江 键, 梁媛媛, 崔黎丽, 程 亮, 孔玉秀, 汤 莹, 等. 静电场对大鼠皮肤角质层结构的调控[J]. 河北大学学报:自然科学版, 2007, 27:606-609.
- [6] 崔黎丽, 江 键, 张 利, 宋诚荣, 赵卫权, 林锦明. 驻极体促进水杨酸甲酯的体外透皮实验[J]. 第二军医大学学报, 2001, 22: 415-417.
- [7] Cui L L, Jiang J, Zhang L, Song C R, Zhao W Q, Lin J M. Enhancing effect of electrets on transdermal delivery of methyl salicylate *in vitro* [J]. Acad J Sec Mil Med Univ, 2001, 22:415-417.
- [8] 崔黎丽, 韩 冬, 江 键, 李国栋, 宋茂海, 王小平, 等. 多孔 PTFE/PE/PP 驻极体对利多卡因的小鼠皮肤通透性的促进作用研究[J]. 北京理工大学学报, 2005, 25(S 1):122-125.
- [9] 江 键, 崔黎丽, 程 亮, 孔玉秀, 董法杰, 邢 莹, 等. 驻极体与氢酮促进利多卡因透皮吸收的比较研究[J]. 功能材料, 2007, 38(A05):1698-1701.
- [10] 侯雪梅, 崔黎丽, 江 键, 李国栋, 梁媛媛, 宋茂海, 等. 驻极体与化学促渗剂对美洛昔康促渗作用的比较研究[J]. 第二军医大学学报, 2007, 28:709-713.
- [11] Hou X M, Cui L L, Jiang J, Li G D, Liang Y Y, Song M H, et al. Comparison of electret and chemical enhancers in enhancing transdermal delivery of meloxicam [J]. Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28:709-713.
- [12] Nageswara Rao R, Meena S, Raghuram Rao A. An overview of the recent developments in analytical methodologies for determination of COX-2 inhibitors in bulk drugs, pharmaceuticals and biological matrices[J]. J Pharm Biomed Anal, 2005, 39 (3-4):349-363.
- [13] 李好枝. 体内药物分析[M]. 北京:人民卫生出版社, 2008:48-65.
- [14] 夏钟福. 驻极体[M]. 北京:科学出版社, 2001:300-302, 318-320.

[本文编辑] 尹 茶