

DOI:10.3724/SP.J.1008.2012.00617

## 正极性驻极体和氮酮对环孢素 A 的体外透皮促渗作用

梁媛媛<sup>1</sup>, 马琳<sup>1</sup>, 崔黎丽<sup>2</sup>, 董法杰<sup>1</sup>, 刘鸿越<sup>2</sup>, 郭鑫<sup>1</sup>, 江健<sup>1\*</sup>

1. 第二军医大学基础部数理教研室, 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** 研究正极性驻极体与不同浓度氮酮对环孢素 A(cyclosporin A, CsA)的经皮促渗作用,探索驻极体与化学促渗剂联合促渗的可行性及其协同促渗规律。**方法** 以 CsA 为模型药物,用电晕充电技术制备正极性驻极体,通过 Franz 扩散池透皮实验和高效液相色谱技术研究不同表面电位正极性驻极体、不同浓度氮酮及两者联用对 CsA 的体外促渗作用。**结果** +500 V、+1 000 V 和 +2 000 V 驻极体作用离体皮肤 24 h 后,均对 CsA 具有较好的促渗效果;1%、3%、5%氮酮分别作用于皮肤 24 h 后,对 CsA 的稳态透皮速率分别是空白对照组的 6.72、2.11、1.43 倍;不同表面电位正极性驻极体与不同浓度的氮酮联合使用对 CsA 经皮作用 24 h 后,+1 000 V 驻极体与 1%氮酮联用组的促渗效果较好,但不同表面电位的正极性驻极体与不同浓度氮酮联用均没有表现出协同促渗作用。**结论** 正极性驻极体对 CsA 的经皮给药具有一定的促渗作用;正极性驻极体与氮酮联用对 CsA 未见协同促渗作用。

**[关键词]** 驻极体;氮酮;环孢素 A;皮肤给药

**[中图分类号]** R 943.43 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2012)06-0617-04

### Promoting effect of positive polarity electret combined with azone on transdermal penetration of cyclosporin A

LIANG Yuan-yuan<sup>1</sup>, MA Lin<sup>1</sup>, CUI Li-li<sup>2</sup>, DONG Fa-jie<sup>1</sup>, LIU Hong-yue<sup>2</sup>, GUO Xin<sup>1</sup>, JIANG Jian<sup>1\*</sup>

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, China

**[Abstract]** **Objective** To study the effects of positive polarity electret combined with different concentrations of azone in promoting the transdermal delivery of cyclosporin A, so as to explore the feasibility and the rule of electret combined with chemical enhancers in promoting transdermal delivery. **Methods** Cyclosporin A was used as the model drug in the present study. Positive polarity electret was prepared using corona charge technique. Franz diffusion cell system and HPLC techniques were applied to investigate the roles of positive polar electret, azone of different concentrations and their combination in promoting penetration of cyclosporin A *in vitro*. **Results** Satisfactory penetration promoting effects for cyclosporin A was observed in excised skin 24 h after exposure to +500 V, +1 000 V and +2 000 V electret. Compared to the control group, 1%, 3%, and 5% azone promoted the steady-state penetration rates of cyclosporin A by 6.72, 2.11, and 1.43 folds after 24 h exposure. Combination of +1 000V electret plus 1% azone showed better penetration promoting effect than other combinations, but electret with different positive charges and different concentrations of azone showed no synergistic effect in promoting cyclosporin A penetration. **Conclusion** Positive polarity electret has a penetration promoting effect for transdermal delivery of cyclosporin A. Positive polarity electret and azone show no synergistic effect on promoting penetration of cyclosporin A.

**[Key words]** electret; azone; cyclosporin A; cutaneous administration

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(6): 617-620]

环孢素 A(cyclosporin A, CsA)的相对分子质量为 1 202.63,是真菌产生的一种由 11 个氨基酸组成的天然脂溶性环状多肽。CsA 口服后易受肝脏等首过效应的影响而导致药物吸收缓慢、不完全,个体差

异性较大<sup>[1]</sup>。为了获得较为满意的生物利用度,近年来开发了 CsA 新型制剂:微乳、口服液、栓剂和纳米粒包裹等<sup>[2]</sup>,但临床发现其口服制剂的生物利用度低,约为 10%~60%,这可能与 CsA 的剂型和胃

**[收稿日期]** 2012-02-08 **[接受日期]** 2012-03-31

**[基金项目]** 国家自然科学基金(50577066, 50977089),上海市自然科学基金(10ZR1437600). Supported by National Natural Science Foundation of China (50577066, 50977089) and Natural Science Foundation of Shanghai (10ZR1437600).

**[作者简介]** 梁媛媛,硕士,讲师. E-mail: liangyy\_208@163.com

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

肠道的生理状态有关<sup>[3]</sup>,因此如何利用更优异的剂型来促进 CsA 的吸收成为其能否在临床发挥疗效的关键。

本课题组在前期开展的驻极体促进小分子局部麻醉药利多卡因<sup>[4]</sup>和非甾体抗炎药物美洛昔康经皮给药研究<sup>[5]</sup>的基础上,开展驻极体促进多肽类药物的经皮给药研究。我们以 CsA 为模型药物,利用改良的 Franz 扩散池和高效液相色谱仪,通过体外经皮扩散实验,检测 CsA 体外经皮给药后的浓度,比较正极性不同表面电位驻极体、不同浓度氮酮及两者联合使用对药物的促渗作用,从而阐明驻极体与化学促渗剂单独和联合使用对 CsA 经皮转运的效果。

## 1 材料和方法

### 1.1 仪器和试剂、动物

聚丙烯(日本东丽株式会社 TORAY FAN BO Japan,膜厚 13  $\mu\text{m}$ );栅控电晕充电系统(大连理工大学静电与特种电研究所);等效表面电位测量仪(ESR102A 型,北京华晶汇科技有限公司);RYJ-6B 型药物透皮扩散试验仪(上海黄海药检仪器有限公司);FA1004 型电子天平(上海天平仪器厂);Hi-tech 超纯水系统(Hi-tech 设备有限公司);Agilent-1100 高效液相色谱仪(美国安捷伦科技有限公司);环孢素 A(上海源叶生物科技有限公司);氮酮(福建寿宁美菲思生物化学用品厂,纯度 $\geq 99.0\%$ );乌拉坦(化学纯,上海国药集团化学试剂有限公司)。

雄性 Sprague-Dawley (SD)大鼠,清洁级,体质量(220 $\pm$ 10) g,购自第二军医大学实验动物中心,使用许可证号:SYXK(沪)2007-0003,生产许可证号:SCXK(沪)2007-0003。

### 1.2 驻极体的制备

采用栅控恒压电晕充电系统对双裸面聚丙烯薄膜进行充电,电晕电压为-10 000 V,栅压分别为+500 V、+1 000 V和+2 000 V,充电 5 min,制得+500 V、+1 000 V和+2 000 V驻极体。驻极体的等效表面电位通过补偿法测量。

### 1.3 模型制作与实验分组

将 SD 大鼠小心剃去腹部鼠毛,处死后立即剥离皮肤,去除皮下脂肪组织和粘连物。将皮肤标本进行如下分组:(1)空白对照组,CsA 溶液单独渗透大鼠皮肤;(2)驻极体促渗组,将+500 V、+1 000 V和+2 000 V驻极体分别置于 CsA 溶液中,构成+500 V驻极体组、+1 000 V驻极体组和+2 000 V驻极体组;(3)化学促渗剂促渗组,分别含 1%、3%、5%氮酮的 CsA 溶液的经皮促渗组;(4)驻极体和化学促渗剂联合促渗组,将驻极体置于含不同比例氮酮的 CsA 溶液中,构成+500 V、+1 000 V和+2 000 V驻极体均与 1%、3%、5%

氮酮配伍的经皮联合促渗实验组。

### 1.4 Franz 扩散池透皮吸收实验

将大鼠皮肤剪成合适大小夹于 Franz 扩散池的供给池和接收池之间,角质层面向供给池。在接收池中加入接受液,根据分组情况将空白对照组溶液或不同比例化学促渗剂的药物溶液加入供给池中,再把相应的驻极体置于供给池上,(37.0 $\pm$ 0.5) $^{\circ}\text{C}$ 恒温条件下,磁力搅拌速度为 320 r/min。于 8、12、16、20 和 24 h 取样,每次取样 1 ml,并补充等量的接受介质。

### 1.5 高效液相色谱实验

每次取出的样品经 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤后,用 Agilent-1100 高效液相色谱仪测定峰面积(A)值,色谱柱为 Diamonsil<sup>TM</sup> ODS 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm,5  $\mu\text{m}$ ,迪马公司),流动相为乙腈-甲醇-水(340:100:60,V/V/V),流速 1 ml/min,柱温 60 $^{\circ}\text{C}$ ,进样量 10  $\mu\text{l}$ ,检测波长为 214 nm。

### 1.6 统计学处理

采用 SPSS 13.0 统计软件进行数据分析。检验水平( $\alpha$ )为 0.05。

## 2 结果

### 2.1 分析方法的确证

本实验分别进行了模型药物 CsA 的专属性考察、标准曲线的建立以及测量方法的精密度及准确度测定,数据表明,在 214 nm 波长下鼠皮溶出物、溶剂物质和各种代谢产物对 CsA 的测定均无干扰;当 CsA 药物浓度(C)在 1.79~143.2  $\mu\text{g/ml}$  范围内,与样品峰面积(A)呈良好的相关性( $r=0.999\ 95$ ),直线回归方程为: $A=13.799\ C-1.226\ 9$ ;日内精密度的 RSD 值最大值为 0.676%,日间精密度 RSD 值最大值为 2.946%,准确度的 RR 值为 100.38%~111.47%,该方法具有良好的精密度、可重复性和高回收率,符合体外药物分析的要求。由图 1 可知,正极性驻极体产生的静电场完全可以透过 CsA 饱和溶液作用于皮肤;不同电压驻极体透过 CsA 饱和溶液常温保存 120 h 后,其表面电位仍保持初始电位的 50%~70%,具有良好的电荷储存稳定性。

### 2.2 驻极体对 CsA 经皮渗透的影响

由图 2 可知,在 0~8 h 作用范围内,空白对照组和各驻极体促渗组 CsA 经皮渗透的累积渗透量(Q)值均为 0,说明 CsA 的经皮渗透具有一定的迟滞效应,且迟滞时间至少长达 4 h。在 8~24 h 范围内,对照组 CsA 的累积渗透量随时间增加,按指数规律上升;不同极性驻极体对 CsA 均有一定的促渗效果,各驻极体促渗组对 CsA 的累积渗透量均随时间变化呈近指数规律上升,+2 000 V驻极体的促渗效果最佳。24 h 后空白对照组 CsA 的 Q 值为(6.283 5 $\pm$ 2.36)  $\mu\text{g/cm}^2$ ,稳态透皮速率( $J_s$ )为 0.352 9  $\mu\text{g}/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})$ ;+2 000 V驻极体

促渗组的 Q 值为  $(9.4083 \pm 0.66) \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ,  $J_s$  为  $0.5364 \mu\text{g}/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})$ , 分别是空白对照组的 1.50 倍和 1.52 倍。

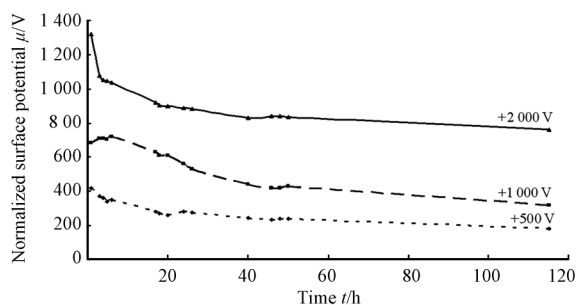


图 1 驻极体透过 CsA 饱和溶液的电压衰减曲线  
Fig 1 Surface potential decay of electret through cyclosporin A (CsA) saturated solution

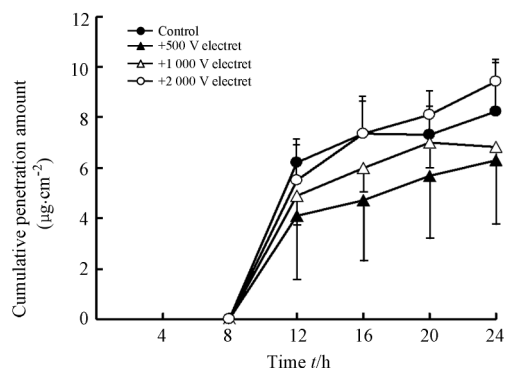


图 2 驻极体作用下 CsA 的透皮量

Fig 2 Cumulated amount of cyclosporin A (CsA) penetration through rat skin *in vitro* by electret

$n=12, \bar{x} \pm s$

2.3 化学促渗剂对 CsA 经皮渗透的影响 由图 3 可知, 含 1%、3% 和 5% 氮酮的 CsA 溶液作用离体皮肤 8 h 后, CsA 的 Q 值分别为  $(26.79 \pm 9.38) \text{mg}/\text{cm}^2$ 、 $(20.19 \pm 11.44) \text{mg}/\text{cm}^2$ 、 $(18.94 \pm 14.33) \text{mg}/\text{cm}^2$ , 而空白对照组为 0, 说明不同浓度的氮酮可有效缩短 CsA 的滞留时间, 促进 CsA 经皮渗透。1%、3%、5% 氮酮作用离体皮肤 24 h 后, CsA 的 Q 值分别为  $(66.35 \pm 22.62)$ 、 $(31.71 \pm 12.44)$  和  $(21.40 \pm 6.70) \mu\text{g}/\text{cm}^2$ , 分别是空白对照组的 10.56、5.05 和 3.41 倍。3 个促渗组的  $J_s$  分别为 2.372 9、0.744 9 和 0.508  $\mu\text{g}/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})$ , 分别是空白对照组的 6.72、2.11、1.43 倍。经统计分析, 含 1%、3%、5% 氮酮的 3 个促渗组 24 h 对 CsA 的 Q 值方差齐性, 且差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。不同浓度氮酮对 CsA 的促渗能力由大到小依次排序为: 1% 氮酮 > 3% 氮酮 > 5% 氮酮。

2.4 驻极体和化学促渗剂联用对 CsA 经皮渗透的影响 由图 4 可知, 除了 +1000 V 驻极体分别与

1% 氮酮联合促渗组 CsA 的 Q 值略高于 1% 氮酮促渗组外, +500 V 驻极体和 +2000 V 驻极体分别与 1% 氮酮联用对 CsA 的 Q 值均小于 1% 氮酮促渗组, 说明驻极体分别与 1% 氮酮联用时, +500 V 驻极体和 +2000 V 的驻极体都不能对 CsA 产生协同促渗作用。我们还研究了不同表面电位正极性驻极体分别与 3%、5% 氮酮联用对 CsA 体外经皮促渗累积透过量与时间的关系, 得到了与上述结果相似的结论。

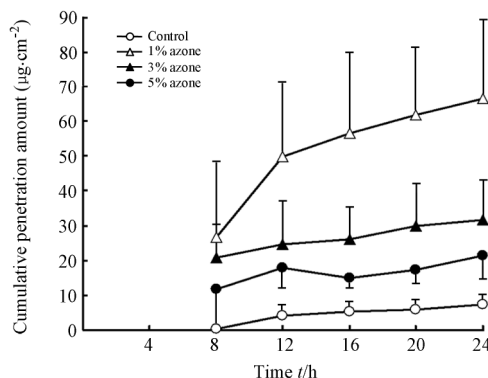


图 3 不同浓度氮酮作用下 CsA 的透皮量

Fig 3 Cumulated amount of cyclosporin A (CsA) penetration with different concentrations of azone

$n=12, \bar{x} \pm s$

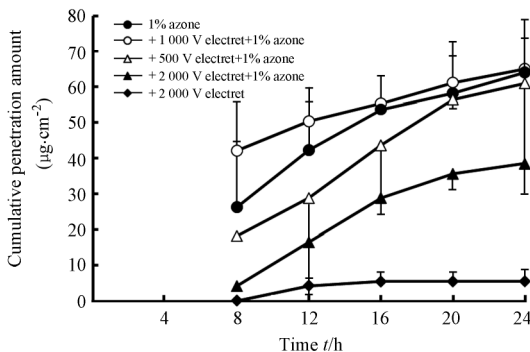


图 4 不同表面电位正极性驻极体与 1% 氮酮对 CsA 体外透皮累积渗透量

Fig 4 Effect of electrets with different surface potentials combined with 1% azone on cumulated amount of cyclosporin A (CsA) penetration through rat skin *in vitro*

$n=12, \bar{x} \pm s$

### 3 讨论

本实验通过体外 Franz 扩散池透皮实验和高效液相色谱技术对正极性不同表面电位的驻极体、不同浓度氮酮和两者联用对 CsA 的体外促渗规律进行了比较研究。结果显示, 不同表面电位的正极性驻极体在 8~24 h 内均对模型药物具有一定的促渗效果, 且以 +2000 V 驻极体的促渗效果最佳, 这说明驻极体经皮给药技术可以实现对大分子多肽类药

物的经皮吸收,我们推测可能是其产生的持续稳定的静电场和微电流使皮肤角质层脂质双分子间形成暂时可逆的通道,从而有利于药物的经皮渗透。但驻极体促进药物的经皮渗透是多种因素协同作用的结果,其机制还在进一步研究中,所以驻极体对于模型药物的促渗作用不一定与驻极体表面电位呈必然的量效关系;在实际经皮给药的过程中,它还与药物分散在介质中的带电情况、溶解状况、油/水分配系数等物理性质有关。本课题组在不同电压、不同极性的驻极体促渗机制方面也进行了进一步的实验,最新的实验结果已另文发表<sup>[6-7]</sup>。

在本实验中,低浓度(1%)的氮酮对 CsA 具有更好的促渗效果,我们推测这主要与它和药物的物理化学性质方面的交互作用有关<sup>[8]</sup>。氮酮在促进药物透皮吸收时,可以增加皮肤角质层含水量,使该层细胞(尤其是基底角质层的细胞)膨胀,药物在该层形成储库,从而维持一定的药物释放和作用时间,促进水溶性物质经水性通道渗透吸收<sup>[9]</sup>。氮酮浓度越高,水化作用越强,从而使得脂溶性的 CsA 溶解后渗入角质层形成积聚,在有限的时间内不易渗透到接受液中。1%氮酮的浓度相对较低,接受液形成的漏槽效应不足以将 CsA 大量溶解滞留而不经皮渗透,所以低浓度氮酮适宜对 CsA 的经皮促渗。Afouna 等<sup>[10]</sup>也认为,在经皮给药系统中,氮酮的促渗作用可能与药物的分配参数、细胞膜的渗透性、磷酸化等因素有关,不同浓度的氮酮对药物的促渗程度不同。

正极性不同表面电位驻极体与不同浓度氮酮对 CsA 经皮促渗 24 h 后,均表现出较优异的促渗效果,提示二者联用具有可行性,可以共同促进模型药物的透皮吸收。而结果显示氮酮不能与驻极体产生协同作用,我们推测这可能与氮酮对模型药物的带电特性、驻极体外静电场对模型药物的极化规律密切相关。所以,如何合理选择驻极体的电压甚至极性,以及驻极体与不同化学促渗剂之间的配伍方案,是实现驻极体与化学促渗剂联合促渗效果是否优异的关键。

随着人们对驻极体促渗技术研究及认识的不断深入,驻极体促进药物经皮吸收的研究正逐渐引起国外学者的关注,2008年国外有文献报道驻极体促进药物的经皮渗透<sup>[11]</sup>。但总体而言,国内外将驻极体促渗技术应用于透皮吸收的研究尚处于起步阶段,驻极体促渗技术的机制还不明确。已有报道表明 CsA 可通过甘油单油酸酯的化学促渗作用经皮渗透<sup>[8,12]</sup>,甘油单油酸酯是中性分子,较其他蛋白质多肽类药物性质稳定,不易发生团聚、生理 pH 值下荷电等变性问题,是较理想的大分子模型药物。本实验选用 CsA 作为模型药物,通过物理学、药剂学

等实验方法系统研究驻极体对 CsA 的经皮吸收、传递和代谢,结果表明驻极体作为一种新型透皮给药技术对高亲脂性环肽药物 CsA 具有良好的透皮促渗作用,有效地提高了 CsA 累积渗透量和稳态透皮速率,但驻极体与不同种类和浓度化学促渗剂的相互作用方面的机制还有待于进一步研究。

#### 4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] 刘娟. 环孢菌素 A 的合成及其治疗糖尿病新进展[J]. 河北化工, 2009, 32: 23-24.
- [2] Czogalla A. Oral cyclosporine A-the current picture of its liposomal and other delivery systems[J]. Cell Mol Biol Lett, 2009, 14: 139-152.
- [3] 吴俊珠, 金拓. 环孢菌素 A 安全应用及药动学研究新进展[J]. 中国药房, 2007, 18: 634-637.
- [4] 孔玉秀, 程亮, 肖永恒, 王冬, 江键, 崔黎丽. 驻极体利多卡因贴剂的透皮促渗作用[J]. 第二军医大学学报, 2009, 30: 469-472. Kong Y X, Cheng L, Xiao Y H, Wang D, Jiang J, Cui L L. Enhancing effects of electret on transdermal delivery of lidocaine patches *in vitro*[J]. Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30: 469-472.
- [5] 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. 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.
- [6] Cui L L, Liang Y Y, Dong F J, Ma L, Tu Y, Liu H Y, et al. Structure of rat skin after application of electret characterized by DSC[J]. J Phys: Conf Ser, 2011, 301: 12-27.
- [7] Cui L L, Liang Y Y, Dong F J, Liu H Y, Jiang J. Thermal analysis for studies of electret states of rat skin [C]//Electrets (ISE), 2011 14<sup>th</sup> International Symposium on Montpellier, France. Browse Conference Publications, 2011: 179-180.
- [8] Lopes L B, Collett J H, Bentley M V. Topical delivery of cyclosporin A: an *in vitro* study using monoolein as a penetration enhancer[J]. Eur J Pharm Biopharm, 2005, 60: 25-30.
- [9] 侯雪梅, 李国栋, 李卫华. 化学促渗剂及其机理的探讨[J]. 上海医药, 2008, 29: 231-235.
- [10] Afouna M I, Fincher T K, Zaghoul A A, Reddy I K. Effect of Azone upon the *in vivo* antiviral efficacy of cidofovir or acyclovir topical formulations in treatment/prevention of cutaneous HSV-1 infections and its correlation with skin target site free drug concentration in hairless mice [J]. Int J Pharm, 2003, 253: 159-168.
- [11] Narasimha Sathyanarayana Murthy N S, Boguda V A, Payasada K. Electret enhances transdermal drug permeation [J]. Biol Pharm Bull, 2008, 31: 99-102.
- [12] Lopes L B, Lopes J L, Oliveira D C, Thomazini J A, Garcia M T, Fantini M C, et al. Liquid crystalline phases of monoolein and water for topical delivery of cyclosporin A: Characterization and study of *in vitro* and *in vivo* delivery[J]. Eur J Pharm Biopharm, 2006, 63: 146-155.