

· 基础研究 ·

超声波对盐酸青藤碱凝胶经皮渗透的促进作用

李立安 赵健乐 李新平 王鸿 高建青

【摘要】目的 研究超声波对盐酸青藤碱经皮渗透的影响。**方法** 取离体 Sprague-Dawley 大鼠皮肤,置于改良 Franz 扩散池,皮肤角质层朝上,并均匀涂抹盐酸青藤碱凝胶,保持扩散体系温度为 $(32 \pm 0.5)^\circ\text{C}$,接受介质采用 20% 聚乙二醇 400 生理盐水溶液。实验分为药物被动经皮渗透组(对照组)和药物超声波透入组(超声波组)。对照组不加超声波作用,超声波组按超声波作用参数不同分为 T_a 组(频率 800 kHz,强度 0.75 W/cm^2 ,作用时间 10 min)、 T_b 组(频率 1 MHz,强度 0.70 W/cm^2 ,作用时间 10 min)、 T_c 组(频率 1 MHz,强度 0.35 W/cm^2 ,作用时间 10 min)、 T_d 组(频率 800 kHz,强度 1.50 W/cm^2 ,作用时间 10 min)和 T_e 组(频率 800 kHz,强度 1.50 W/cm^2 ,作用时间 5 min)。每组均同时进行 6 个平行实验,每个平行实验持续时间为 8 h,每隔 1 h 分别吸取接受室溶液,并加入空白接受介质,测定接受液药物浓度,计算平均累积单位面积渗透量 Q ($\mu\text{g/cm}^2$) 和平均稳态透皮速率 J_s ($\mu\text{g/cm}^2/\text{h}$),并进行比较。**结果** 对照组 Q_{sh} 值为 $(20.65 \pm 10.23)\mu\text{g/cm}^2$, J_s 值为 $(3.02 \pm 0.11)\mu\text{g/cm}^2/\text{h}$; T_a 、 T_b 组的 Q_{sh} 和 J_s 值均明显高于对照组 ($P < 0.05$); T_b 组 Q_{sh} 和 J_s 值明显高于 T_c 组 ($P < 0.05$); T_d 组 Q_{sh} 和 J_s 值明显高于 T_a 组和 T_e 组 ($P < 0.05$)。超声波透入后,皮肤组织切片经光学显微镜观察没有明显改变,扫描电子显微镜下可见角质层表面呈现粗糙、多孔状。**结论** 超声波透入对盐酸青藤碱的经皮吸收有明显促进作用,渗透效果与超声波强度、作用时间有关,超声波作用的强度在 $0 \sim 1.5\text{ W/cm}^2$ 范围内,对皮肤组织比较安全。

【关键词】 盐酸青藤碱; 经皮渗透; 超声波透入

The effect of phonophoresis on transdermal delivery of sinomenine hydrochloride gel in vitro LI Li-an*, ZHAO Jian-le, LI Xin-ping, WANG Hong, GAO Jian-qing. *Department of Pharmacy, Affiliated Hospital of Hangzhou Normal University, Hangzhou 310015, China

Corresponding author: GAO Jian-qing, Email: gaojianqing@zju.edu.cn

【Abstract】Objective To study the effect of phonophoresis on transdermal delivery of sinomenine hydrochloride (SH) gel in vitro. **Methods** Ultrasound at one of two frequencies (800 kHz or 1 MHz) was applied with a sonicator with a transducer in this study. The skin of male Sprague-Dawley rats was used as the model and SH gel was used as the ultrasound couplant. The permeation rate of SH was detected using a modified Franz diffusion cell maintained at $32 \pm 0.5^\circ\text{C}$ and filled with 20% polyethylene glycol 400 physiological saline solution. The transdermal phonophoresis experiments were carried out in five groups: Group T_a , $f = 800\text{ kHz}$, $I = 0.75\text{ W/cm}^2$, $t = 10\text{ min}$; Group T_b , $f = 1\text{ MHz}$, $I = 0.7\text{ W/cm}^2$, $t = 10\text{ min}$; Group T_c , $f = 1\text{ MHz}$, $I = 0.35\text{ W/cm}^2$, $t = 10\text{ min}$; Group T_d , $f = 800\text{ kHz}$, $I = 1.5\text{ W/cm}^2$, $t = 10\text{ min}$ and Group T_e , $f = 800\text{ kHz}$, $I = 1.5\text{ W/cm}^2$, $t = 5\text{ min}$. There was also a control group (C) in which the SH was allowed to diffused passively. Samples were withdrawn at the indicated intervals and the concentration of SH was determined by high-performance liquid chromatography. The transdermal parameters such as average accumulated delivery quantity per unit area Q_{sh} , average transdermal steady delivery rate J_s and T_{lag} were calculated. **Results** The Q_{sh} and J_s of the control group were $20.65 \pm 10.23\mu\text{g/cm}^2$ and $3.02 \pm 0.11\mu\text{g/cm}^2/\text{h}$ respectively. The phonophoresis parameters in groups T_a and T_b were, on average, significantly higher than in the control group. The parameters in group T_b were significantly larger, on average, than in T_c . In group T_d the parameters were significantly larger than in groups T_a and T_e . **Conclusions** The results show that phonophoresis can enhance the transdermal delivery of SH. Phonophoresis variables such as frequency and time influence its effects on drug permeation. Almost no change was observed in the structure of the skin after phonophoresis, though

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2010.05.003

基金项目:杭州市医药卫生科技计划项目(2006B020)

作者单位:310015 杭州,杭州师范大学附属医院暨杭州市第二人民医院药剂科(李立安);武警浙江总队杭州医院物理康复中心(赵健乐);浙江大学药物制剂研究所(李新平、高建青);浙江医学高等专科学校药剂教研室(王鸿)

通信作者:高建青,Email:gaojianqing@zju.edu.cn

under a scanning electron microscope the surface of the corneum appeared rough and porous. Phonophoresis is therefore an effective and safe method for SH transdermal delivery, and the effect is positively relation with the applied intensity and exposure time.

【Key words】 Sinomenine hydrochloride; Percutaneous penetration; Phonophoresis

青藤碱(sinomenine)是从中药青风藤中提取的单体生物碱,化学结构类似吗啡,临床多用其盐酸盐,具有抗炎、镇痛、免疫抑制、降血压及抗心律失常等药理作用。而且青藤碱可选择性抑制前列腺素合成限速酶——环氧化酶-2,从而发挥明显的抗炎、镇痛作用,现已作为治疗类风湿性关节炎等风湿病的药物用于临床^[1-2]。但由于青藤碱注射的依从性差,口服的生物利用度低、半衰期短、不良反应多,因此关于青藤碱透皮吸收的研究具有重要意义。

超声波透入疗法(phonophoresis)作为一种无创性物理治疗手段,主要通过机械效应、热效应以及化学效应对生物组织起作用,对组织有良好的穿透性,目前已广泛应用于骨骼肌肉系统(如全身各关节、骨、软组织)损伤的诊断、评价及治疗中,对创伤愈合有明显的促进作用^[3-4]。有研究表明,超声波药物透入治疗慢性软组织损伤疗效良好^[5],治疗颈背肌筋膜炎与传统的药物注射疗效相当,且简单易行,患者依从性好^[6]。然而,将超声波用于促进药物经皮渗透的报道较少。我们研究了不同超声参数对盐酸青藤碱凝胶经皮渗透的影响,并进一步观察超声波对皮肤角质层结构的影响,现报道如下。

材料与方法

一、实验动物及分组

采用雄性 Sprague-Dawley 大鼠,先用乙醚麻醉大鼠处死,在其腹部去毛,剥离腹部皮肤后除去皮下脂肪和皮下组织,经生理盐水浸泡后用滤纸吸干备用。实验分为药物被动经皮渗透组(对照组)和药物超声波透入组(超声波组)。对照组不采用任何频率和强度的超声波作用。超声波组根据作用参数不同分为 5 个亚组: T_a 组频率为 800 kHz,强度为 0.75 W/cm^2 ,作用时间为 10 min; T_b 组频率为 1 MHz,强度为 0.70 W/cm^2 ,作用时间为 10 min; T_c 组频率为 1 MHz,强度为 0.35 W/cm^2 ,作用时间为 10 min; T_d 组频率为 800 kHz,强度为 1.50 W/cm^2 ,作用时间为 10 min; T_e 组频率为 800 kHz,强度为 1.50 W/cm^2 ,作用时间为 5 min,均为连续波。每组均同时进行 6 个平行实验。

二、实验材料

主要实验用仪器为 Waters 2669 型高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)分析仪(美国)、XL-30-ESEM 型扫描电子显微镜(荷兰 Philips

公司)、CSL-1 型 800 kHz 超声波治疗仪(上海)、US-88 型 1 MHz 超声波治疗仪(广东)、自制改良 Franz 扩散池、RCT-A 型磁力搅拌器(杭州)。主要实验试剂为 Carbomer 934(上海卡乐康公司)、三乙醇胺(无锡海硕生物有限公司)、氯化钠(国药集团化学试剂有限公司)、丙二醇(浙江杭州双林化工试剂厂)。盐酸青藤碱为西安冠宇生物技术有限公司提供, HPLC 纯度 > 98%。

三、盐酸青藤碱分析方法的建立

据文献报道^[7-8]并结合具体实验,选择迪马 ODSC18 色谱柱($4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}, 5 \mu\text{m}$);柱温为 25°C ;流动相: 0.1 mol/L 磷酸二氢钠:甲醇(70:30, V/V);检测波长为 262 nm;流速为 1.0 ml/min ;进样量 $10 \mu\text{l}$ 。以盐酸青藤碱原料为对照品,外标法定量。理论塔板数按盐酸青藤碱洗脱峰计算不低于 2000。

精确称取干燥至恒重的盐酸青藤碱,用流动相分别配制浓度为 2, 4, 8, 16, 24 和 $32 \mu\text{g/ml}$ 的盐酸青藤碱标准溶液,按上述色谱条件测定样品,以盐酸青藤碱峰面积的积分值(A)对浓度(C)进行回归,得标准曲线方程为: $A = 7357.8C - 229.05$ ($r = 0.9997$)。

回收率试验:按处方比例配成空白基质,加入不同量的盐酸青藤碱,混合均匀;称取 0.5 g 置于 100 ml 量瓶中,用适量甲醇振摇;超声提取 30 min,使青藤碱溶解,过滤时弃初滤液;取续滤液 5.0 ml 置于 50 ml 量瓶中,再加甲醇至刻度;于冰箱中放置 4 h 后取出,迅速用 $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤,取滤液 $10 \mu\text{l}$ 进样,记录峰面积,计算回收率。

样品的测定:所取接受液经微滤器(孔径为 $0.45 \mu\text{m}$)的过滤,取续滤液,记录峰面积,并按标准曲线方程计算其含量。

实验中,皮肤浸出液成分在 3.5 min 内洗脱出柱,盐酸青藤碱的洗脱峰良好,因此皮肤浸出液成分不干扰药物含量的测定。

四、盐酸青藤碱凝胶的制备

根据盐酸青藤碱的理化性质和文献报道^[7-8],按以下处方制备药物凝胶:称取 2 g 的 Carbomer 934,均匀撒于适量水中,使其逐渐溶解膨胀,并静置 12 h;称取盐酸青藤碱 3 g ,加适量蒸馏水溶解,加至凝胶基质中;加入丙二醇 10 ml ,边搅拌边加入适量三乙醇胺,控制 pH 值为 $6.0 \sim 6.5$,加蒸馏水至 100 g ,继续搅拌,即得半透明盐酸青藤碱凝胶。

五、体外经皮吸收试验

将离体鼠皮角质层朝上,固定在改良 Franz 扩散池固定片与接受池之间,排尽气泡,循环水保持 $(32 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 。接受池以 20% 聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG) 400 的生理盐水为接受介质,加搅拌子以 300 转/min 的速度搅拌。最后在角质层上均匀涂抹药物凝胶。

在角质层上均匀涂抹药物凝胶完毕后,将超声波声头轻置于皮肤表面,控制声头与皮肤角质层的距离为 1 mm,分别采取不同参数的超声波作用,每次作用结束后即取下超声波声头。

每组均于药物凝胶涂抹完毕后开始计算取样时间,每隔 1 h 吸取 1 次接受液,记录体积 (V),并补充等量接受液,采用 HPLC 法测定青藤碱药物浓度 (C)。

六、数据处理

根据已知的扩散池有效渗透面积和每次测得的样品药物浓度、吸取的接受液体积,计算每组药物单位时间、单位面积药物渗透量和累积渗透量 (Q_i , i 表示测定时间),以单位面积累积渗透量 Q 为纵坐标,时间 t 为横坐标作图,得到药物累积渗透曲线。对所得曲线的直线部分进行回归,求出斜率,即为药物的稳态渗透速率 J_s ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$),在横坐标上的截距即为药物经皮渗透的时滞 T_{lag} (h)。

七、皮肤切片及显微观察

剪取对照组皮肤和 T_a 和 T_b 组离体皮肤样品各两份。其中一份用 10% 福尔马林溶液固定,制作石蜡组织切片标本,在普通光学显微镜下观察各样品皮肤角质层的结构;另一份先用 20% 戊二醛磷酸溶液固定,然后用 pH 值 7.4 的磷酸缓冲液冲洗 3 次,加 1% 锇酸固定,依次放入 30%、50%、70%、80%、90%、95%、100% 乙醇中脱水各 10 min,再将样品移入乙酸异戊酯中,15 min 后取出,临界点干燥,样品角质层镀金膜;最后在 XL-30-ESEM 型扫描电镜下观察样品皮肤角质层表面结构变化。

八、统计学分析

数据以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,采用 Microsoft Excel 2003 和简明 10.35 版统计软件 (concise statistics 10.35, CS10.35) 处理,用相关回归检验参数间的相关性, t 检验比较均数间的差异。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

结 果

一、盐酸青藤碱的测定

采用 HPLC 法对盐酸青藤碱进行测定,结果表明药物保留时间约为 5 min,与皮肤浸出成分能很好地分离。标准曲线显示浓度范围为 $2.0 \sim 32 \mu\text{g}/\text{ml}$,盐酸青藤碱的洗脱峰面积与浓度有良好的线性关系。样品日内相对标准偏差 (relative standard deviation, RSD)

为 1.56%,日间 RSD 为 3.28%。平均回收率为 100.03%。

二、超声波促进盐酸青藤碱凝胶的经皮渗透

T_a 、 T_b 组的 Q_{8h} 和 J_s 与对照组比较发现,超声波作用能明显促进盐酸青藤碱的经皮渗透 ($P < 0.05$)。在超声频率和透入时间不变的情况下,当超声频率为 1 MHz 时, T_b 组的 Q_{8h} 和 J_s 与 T_c 组比较均明显增加 ($P < 0.05$);而频率为 800 kHz 时, T_d 组的 Q_{8h} 和 J_s 也明显高于 T_a 组 ($P < 0.05$),表明超声波作用强度增大能明显促进盐酸青藤碱的经皮渗透。当超声频率、强度不变时,作用时间为 10 min 的 T_d 组的 Q_{8h} 和 J_s 明显高于作用时间为 5 min 的 T_c 组 ($P < 0.05$),说明超声波作用参数的改变对促进盐酸青藤碱凝胶的经皮渗透也有一定的影响。见表 1 和图 1。

表 1 各组药物经皮渗透参数的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	Q_{8h} ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	J_s ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$)	T_{lag} (h)
对照组	20.65 ± 10.23	3.02 ± 0.11	1.09 ± 0.20
超声波组			
T_a 组	44.45 ± 7.42^a	6.52 ± 0.25^a	1.35 ± 0.21
T_b 组	181.51 ± 34.25^a	26.95 ± 0.72^a	1.39 ± 0.14
T_c 组	86.93 ± 80.37^{ab}	12.00 ± 0.41^{ab}	0.89 ± 0.19
T_d 组	95.87 ± 29.65^{ac}	14.48 ± 0.69^{ac}	1.41 ± 0.26
T_e 组	35.56 ± 12.32^a	4.50 ± 0.25^a	0.35 ± 0.30

注:与对照组比较, $^a P < 0.05$;与 T_b 组比较, $^b P < 0.05$;与 T_a 、 T_c 组比较, $^c P < 0.05$

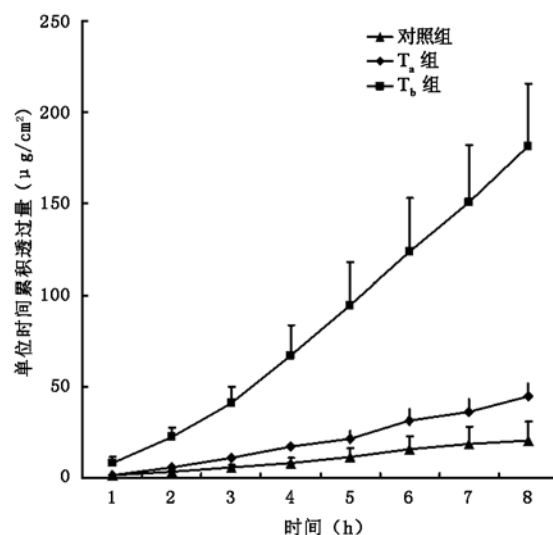


图 1 T_a 组、 T_b 组与对照组单位时间累积透过的比较

三、超声波对皮肤结构的影响

经光学显微镜观察, T_a 组、 T_b 组及对照组样品皮肤角质层的组织结构没有明显改变 (图 2)。扫描电子显微镜下,未经处理的皮肤角质层表面较为光滑,而经超声波透入后的角质层表面呈现粗糙、多孔状 (图 3)。

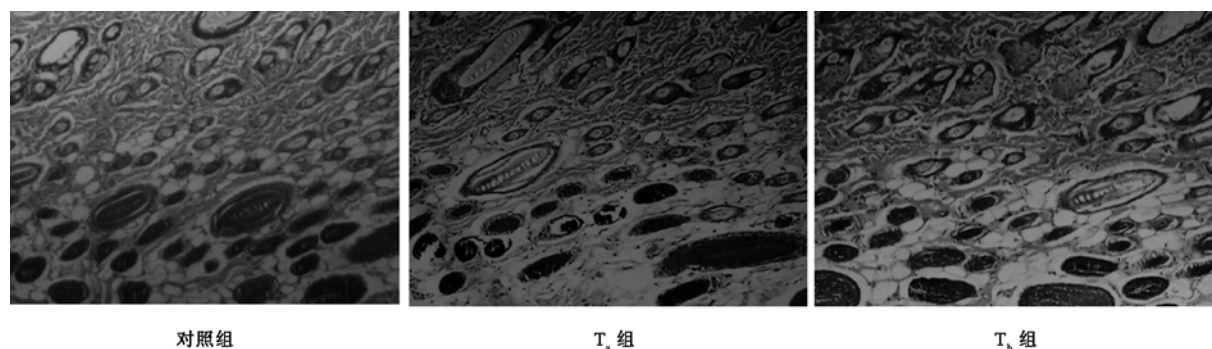
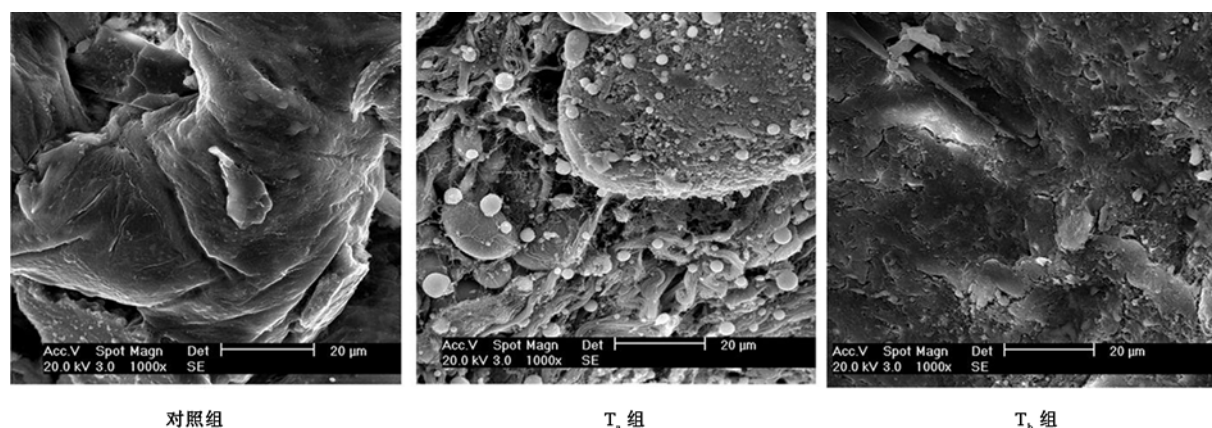
图 2 皮肤角质层组织切片光学显微镜图(HE 染色, $\times 40$)

图 3 皮肤角质层表面电子显微镜扫描图

讨 论

一般认为,脂溶性药物容易透过角质层类脂层疏水区而扩散渗透^[9],盐酸青藤碱比游离型极性大,因此不易透过角质层类脂层疏水区渗透。目前,临床上使用较多的是盐酸青藤碱,若不采用合适的促进渗透的方法则很难达到经皮治疗的目的。本实验结果表明,超声波对盐酸青藤碱的经皮渗透具有显著的促进作用。

超声波促进盐酸青藤碱经皮渗透的效果与其参数有密切关系。一般来说,随着作用时间和强度的增加,药物的透过量也随之增加。选择临床常用的超声波参数进行实验的结果也证实了这一点。有文献报道,随着作用强度或时间的增加,药物的透皮速率随之增加,但增加到一定数值时,药物的透皮速率反而有所下降^[10]。由于临床治疗常用超声波频率均为中高频,容易出现作用部位皮肤温度增高,甚至造成皮肤变性,因此我们并没有采用过大的超声波作用强度和过长的作用时间。

有研究认为,超声波的热效应在物理治疗中可产生重要作用,如增强辐射部位血液循环,降低肌肉和结缔组织张力,缓解痉挛及减轻疼痛,同时可降低感觉神经兴奋性,起到镇痛和促进组织康复的作用^[11]。

本实验中,在皮肤温度没有明显升高的情况下,盐酸青藤碱经皮渗透作用发生了显著改变。这说明我们所采用的 2 种频率超声波,除产生热效应外,尚有其他作用机制存在。分析实验数据发现,皮肤经超声波作用后的单位时间、单位面积药物的透过量比对照组有明显提高,而随着时间的推移,单位时间、单位面积药物透过量呈逐渐下降趋势,与文献报道相似^[12]。因此,我们认为空化效应可能在其中产生重要的作用。超声波的空化效应可能通过改变皮肤角质层的类脂层结构,从而使药物可以经皮肤角质层内的亲水性通道渗透。同时,超声波可能增加角质层表面结构的空气泡,使角质层表面产生很多小孔,药物可以通过这种小孔道渗透进入皮肤角质层,扫描电子显微镜观察也证实了这一点。但光学显微镜观察到,超声波作用后,皮肤角质层组织结构没有明显改变,且作用结束后,药物单位时间渗透量随渗透时间的推移呈下降趋势,说明超声波在作用过程中对药物渗透的影响较大,撤下超声波后,影响逐渐变小。因此认为,本实验采用的超声波所引起的皮肤角质层超微结构的改变具可逆性。

临床研究已表明,超声波对颞颌关节痛、失传入性面部疼痛综合征、颈肩部、腕管综合征等疼痛性疾病疗效确切^[13]。而盐酸青藤碱已广泛用于临床抗炎、镇痛

和免疫调节治疗中,可减轻关节炎性反应,其抗炎功效明显优于透明质酸^[14]。本研究显示,超声波对药物经皮渗透具有明显促进作用,为超声波联合盐酸青藤碱治疗疼痛提供了重要的实验依据,同时也提出了一种新的超声联合治疗方法。

参 考 文 献

- [1] 李乐,张彩玲,宋必卫. 青藤碱的药理研究与临床应用. 中药新药与临床药理,2006,17:310-313.
- [2] 徐广全,王斌,金相元,等. 青藤碱对心脏移植大鼠急性排斥反应及环氧化酶 2 活性的影响. 中华医学杂志,2006,86:911-914.
- [3] 柯丹,刁庆春,李发琪,等. 低强度脉冲超声对人皮肤成纤维细胞增殖及胶原蛋白合成的影响. 中华物理医学与康复杂志,2008,30:17-20.
- [4] 张超,梁国穗,张颖恺,等. 低强度脉冲超声波刺激对人骨髓基质细胞和骨膜细胞生物学效应的影响. 中华物理医学与康复杂志,2005,27:657-660.
- [5] 赵健乐,李新平,刘春华. 超声波药物透入治疗慢性软组织损伤的疗效观察. 中华物理医学与康复杂志,2004,26:510-511.
- [6] 刘琦. 超声波药物透入疗法治疗颈背肌筋膜痛的临床研究. 中华

物理医学与康复杂志,2008,30:193-194.

- [7] 郑红,石力夫,胡晋红. 青藤碱凝胶剂的制备及体外渗透性能研究. 药学服务与研究,2006,6:271-273.
- [8] 张先州,罗顺德,罗毅,等. 盐酸青藤碱凝胶的稳定性研究. 中国中药杂志,2001,26:204-205.
- [9] 陆彬. 药物在皮肤内的转运//梁文权. 药物新剂型与新技术. 北京:人民卫生出版社,1998:356-360.
- [10] Le L, Kost J, Mitragotri S. Combined effect of low-frequency ultrasound and iontophoresis: applications for transdermal heparin delivery. Pharm Res, 2000, 17:1151-1153.
- [11] Gailter H. Therapeutic application of ultrasound. Prog Biophys Mol Biol, 2007, 93:111-129.
- [12] Makoto O, Sumit P, Samir M. Low-frequency sonophoresis: current status and future prospects. Adv Drug Deliv Rev, 2008, 60:1218-1223.
- [13] 李信明,魏安宁. 超声波在疼痛治疗中的应用. 中国临床康复, 2004, 8:306-308.
- [14] 杨惠琴,陈礼荣. 青藤碱对膝骨性关节炎实验兔关节液及血清中 TNF- α 水平的影响. 中华物理医学与康复杂志, 2008, 30:448-450.

(修回日期:2009-08-29)

(本文编辑:吴 倩)

· 消息 ·

关于举办 2010 年国家级继教项目 “吞咽障碍的创新性评估与治疗”学习班的通知

由中山大学附属第三医院与中国康复医学会电诊断专业委员会联合举办的国家级继续医学教育项目“吞咽障碍的创新性评估与治疗”学习班(项目编号:2010-03-10-003,国家级 I 类学分:10 分)定于 2010 年 7 月 16-20 日在中山大学附属第三医院举办。本学习班是继中山大学附属第三医院康复科与《中华物理医学与康复杂志》举办的“中国首届吞咽障碍高峰论坛”之后的又一次重要活动,同时作为中国康复医学会电诊断专业委员会的一次学术活动,将重点介绍肌电生物反馈等新理论、新技术、新方法在吞咽障碍评估与治疗中的应用,并特别邀请加拿大著名吞咽障碍专家 Steele 博士进行授课及示范,期间将安排学员实践操作。欢迎康复医学科、神经科、脑外科、耳鼻咽喉科、消化内科、儿科的医生、治疗师及其他相关学科医务人员踊跃参加。

本次学习班将侧重介绍新知识、新技术的应用,如吞咽障碍筛查方法的效度、敏感性、特异性识别等,气脉冲、振动等刺激如何对吞咽时序性异常进行干预,表面肌电生物反馈治疗吞咽障碍的理论基础、治疗方案等。学习班报名截止日期为 2010 年 6 月 30 日,报到时间为 2010 年 7 月 16 日,报到地点为中山大学附属第三医院康复科,17-18 日上课,授课地点为中山大学附属第三医院讲学厅,19 日操作实践,20 日撤离。本次学习班学费(包括资料费)为 900 元/人;食宿统一安排,费用自理。联系人:刘娟娜;电话:(020)85252357;电邮:zssykf@163.com;通讯地址:510630 广州市天河路 600 号,中山大学附属第三医院康复医学科。

中山大学附属第三医院继续教育科
2010 年 4 月