

· 基础研究 ·

不同物理因子对新乌头碱体外透皮吸收的影响

殷翠萍 岳寿伟 王晓聆

【摘要】目的 观察不同物理因子促新乌头碱(MA)透皮吸收的效果,同时测定新乌头碱透入量与作用时间的关系。**方法** 首先采用高效液相色谱法(HPLC)建立新乌头碱的色谱峰(Y)与含量(X, μg)的标准曲线。选取成年大鼠 28 只,将其随机分成 4 组(每组 7 只)。各组大鼠分别在直流电场、低频脉冲电场、超声场及自由透皮条件下进行离体鼠皮的透皮吸收实验。分离各组大鼠背部皮肤,建立离体透皮吸收模型,采用 V-C 渗透池,将离体鼠皮置于供药池及接受池之间,角质层面面向供药池侧。以含生药 3 g/ml 浓度的生川乌提取液作为释放液,生理盐水作为接受液。各组分别于实验开始后 10, 20, 30, 40 及 50 min 时从接受液中取样,根据已求得的 Y-X 标准曲线测定各取样液中新乌头碱的浓度以及各时间点(t, min)新乌头碱的累积渗透量(Q, $\mu\text{g}/\text{cm}^2$)。通过 Q-t 曲线图求得新乌头碱体外透皮吸收的渗透速率(J, $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$),并以此为参数观察不同物理因子干预条件下新乌头碱的透皮吸收状况以及药物透过量与时间的关系。**结果** 在新乌头碱体外透皮吸收实验开始后 50 min 内,检测到自由透皮组、超声促透组、脉冲电促透组、直流电促透组的渗透速率 J 分别为 4.168, 6.111, 12.268 及 12.623 $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$;对各组的曲线渗透速率进行统计学分析,发现超声促透组和自由透皮组间差异无统计学意义($P > 0.05$);脉冲电促透组、直流电促透组分别与自由透皮组比较,发现其间差异均有统计学意义($P < 0.05$);直流电促透组与脉冲电促透组比较,其间差异无统计学意义($P > 0.05$)。在整个实验过程中,各组新乌头碱的累积渗透量均呈持续性增长。**结论** 在体外透皮吸收过程中,超声对新乌头碱的促透作用不大,直流电和脉冲电的促透作用较明显;直流电与脉冲电促透作用两者间比较,发现差异无统计学意义($P > 0.05$);各组自实验开始后 50 min 内,其新乌头碱的透皮量均随时间延长而持续增多。

【关键词】 体外透皮吸收; 新乌头碱; 直流电; 脉冲电; 超声

The influence of different physical factors on the transcutaneous absorption of mesaconitine in vitro YIN Cui-ping, YUE Shou-wei, WANG Xiao-lin. Department of Rehabilitation, the Qilu Hospital, Jinan 250012, China
Corresponding author: YUE SHOU-wei, Email: shouweiy@sdu.edu.cn

【Abstract】 Objective To compare the effect of three physical factors on transcutaneous mesaconitine absorption, and to determine the relationship between the content of the mesaconitine absorbed and the time used. **Methods** Using high performance liquid chromatography (HPLC) method to establish the standard curve of Peak area (Y) and content (X, μg). Adult rats were randomly divided into 4 groups ($n = 7$). One group was for free transcutaneous absorption, the others were intervened with different facilitative physical factors: ultrasound, pulse current and direct current. the skin were harvested from the back of the anaesthetic rats, and a Valia-Chien osmotic cell was used for test. The samples were obtained from receiving solution after treatment of 10 min, 20 min, 30 min, 40 min and 50 min, respectively. Detecting the content of mesaconitine, and calculate Q (accumulative permeation quantity) at each corresponding time. We obtained the J (transcutaneous absorption speed) from the Q-t curve and compared them in each group. **Results** The transcutaneous speeds (J) of free absorption group, ultrasound group, pulse current group and direct current group were 4.168, 6.111, 12.268 and 12.623 $\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{min}^{-1}$, respectively. There was no significantly statistical differences of J between free group and ultrasound group ($P > 0.05$). Comparing the pulse current group and free absorption group, the direct current group and free group, all have statistical differences ($P < 0.05$). There were no statistical differences of J between the pulse current group and direct current group ($P > 0.05$). In the whole test, the accumulative permeation quantity is persistently increased. **Conclusion** Phonophoresis has little effect on the absorption of mesaconitine. Direct current and pulse current can promote the transcutaneous absorption of mesaconitine. In the first 50 minutes, the absorption of mesaconitine increases with time.

【Key words】 Transcutaneous absorption; Mesaconitine; Direct current; Pulse current; Ultrasound

乌头是我国的传统中药之一,具有抗炎、镇痛、免

疫抑制等功效^[1]。双酯型生物碱是乌头的重要生理活性物质之一^[2],乌头透皮吸收主要为生物碱透过皮肤发挥药理作用。直流电导入乌头生物碱是治疗骨关节炎、肌纤维炎等所致疼痛的常见方法,其镇痛作用可

作者单位:250012 济南,山东大学齐鲁医院康复医学科(殷翠萍、岳寿伟);山东大学物理医学教研室(王晓聆)

通讯作者:岳寿伟,Email:shouweiy@sdu.edu.cn

维持 3.5~4.5 h。由于乌头生物碱自由透皮的透过率较低,药物的效量比值小,故临床多辅以各种物理因子促其透皮吸收效率提高。

目前常用的物理促透手段多为直流电,皮肤角质层是阻碍乌头生物碱透过的主要因素,角质层在恒定的电场作用下能产生极化电场,该电场的方向与直流电场方向相反,能阻碍乌头生物碱离子在电场中的迁移。因此有学者认为,以脉冲电流作为促透因子,可减少极化电场的产生,增强乌头碱的透皮效能^[3];此外超声也是临床常用的药物促透因子,它通过改变机体角质层结构,减弱药物透皮时的皮肤阻抗,从而达到促透目的。

新乌头碱(mesaconitine, MA)是一种重要的乌头生物碱,相关实验发现该物质在缓冲液中电离为带正电荷的生物碱离子。本研究通过采用高效液相色谱分析法(high performance liquid chromatography, HPLC)来测定新乌头碱的体外透皮速率,从而对不同物理因子促乌头碱透皮吸收的效果进行比较。现报道如下。

材料与方法

一、实验材料

1. 实验动物及分组:共选取体重为 180~200 g 的 Wistar 大鼠 28 只,将其随机分为 4 组(每组 7 只),各组大鼠的透皮条件分别为:①自由透皮组,无促透因素;②直流电促透组,给予直流电干预,强度为 0.1 mA/cm²;③脉冲电促透组,给予低频脉冲电干预,强度为 0.1 mA/cm²,频率为 70 Hz;④超声促透组,超声强度为 0.5 W/cm²,频率为 800 kHz。首先在室温环境下用乙醚麻醉各组大鼠,背部清洁,用剪刀紧贴皮肤去毛后取适量面积鼠皮,分离皮下组织及脂肪,经生理盐水、蒸馏水洗净后用滤纸吸干。

本研究所用仪器包括 LC-6A 型高效液相色谱仪(日本岛津公司产)、CLC-ODS 柱(Shim-Pack 公司产)、Valia-Chien 扩散-吸收池(由中国科学院上海有机化学研究所研制)、超级恒温水浴器(上海实验仪器厂)、多功能磁力搅拌器(上海市南汇电讯器材厂);所用药物及试剂包括新乌头碱标准品(中国药品生物制品检定所提供);枸橼酸-磷酸氢二钠缓冲液(pH 值为 6.0),按 1990 版中国药典配制;甲醇、乙腈为色谱纯;SDS、NaH₂PO₄、二氯甲烷及生理盐水均为分析纯。

二、实验方法

1. 新乌头碱回归方程建立:首先建立新乌头碱标准曲线,色谱条件为 ODS 色谱柱;流动相为甲醇-水-乙腈[67:33:2, 内含 6 mmol/L SDS 及 0.02 mol/L NaH₂PO₄ 缓冲液, pH 值为 (4.5 ± 2.0)], 检测波长为 240 nm,流速控制为 1.0 ml/min,柱温保持在 30℃;精

确称取待测品新乌头碱 3.031 mg,用二氯甲烷溶解,定量转移至 10 ml 量瓶中,加二氯甲烷至标记刻度后摇匀,作为对照品;然后再分别提取对照品溶液 1, 2, 3, 4, 5, 6 μl 进样,测定新乌头碱的峰值面积,重复测量 3 次,记录平均峰面积(Y)及对应新乌头碱量(X, μg)。经统计学回归分析后绘制 Y-X 标准曲线,求得回归方程为 $Y = 481452.2X - 3966.24$ ($r = 0.9990$, 线性范围为 0.3031 ~ 1.8186 μg)。精密度测定 RSD = 2.84% ($n = 6$),日内稳定性实验 RSD = 1.4% ($n = 10$)。

2. 乌头提取液的制备:取川乌粉碎至粗粉状态,乙醇溶解,将乙醇液回收后的浓缩物用酸水溶解,再经脱色、碱化处理后用氯仿萃取,经氯仿液水洗、脱水回收氯仿,残留物用乙醇溶解,定容至含生药 3 g/ml 的浓度,即得到川乌生物碱提取液,用于离体透皮吸收释放液。

3. 透皮吸收操作:Valia-Chien 渗透池由两个半池构成,每个半池体积约为 6 ml,池口有效扩散面积为 2.35 cm²,池内装有微型磁力搅拌子,由恒速的磁力搅拌器驱动搅拌桨叶转动以保持两池内药物浓度平衡。两个半池分别为供药池和接受池,剪取适当大小面积的大鼠皮肤固定于两池接合处,角质层面向供药池,真皮层面向接受池,池口接合处用密封带封紧,再用铁夹夹牢。供药池内以 3 g/ml 生川乌提取液作为释放液,经两池之间的大鼠皮肤渗透至接受池内,接受液为生理盐水。脉冲电及直流电正极位于供药池侧,负电极位于接受池内,电极和皮肤方向平行。超声组探头置于释放液内,距离鼠皮 1 cm。各组均在实验开始后即刻接通电源,开动恒温器水泵保持两池内温度为 (37 ± 0.5)℃,恒速搅拌。于实验开始后 10, 20, 30, 40 及 50 min 定时吸取接受池溶液 0.5 ml,离心后待测;同时向接受池内添加 0.5 ml 接受液以保持原体积不变。

4. 测定各取样点新乌头碱浓度:对照标准品检测样品新乌头碱色谱图及峰面积,根据其数据求得新乌头碱标准曲线,计算各供药系统不同时间点接受液中对应新乌头碱的浓度。

三、统计学分析

累积透过量(accumulative permeation quantity, Q)

计算公式为: $Q = 6Cn/A + 0.5 \sum_{i=1}^{i=n-1} ci/A$ (μg/cm², Cn 为第 n 个取样点测得的药物浓度;Ci 为第 i 个取样点测得的药物浓度;A 表示池口有效扩散面积,其值为 2.35 cm²)。渗透速率(percutaneous speed, J) 计算应用 SPSS 11.5 版统计分析系统,以累积透过量 Q (μg/cm²) 对透皮吸收时间 T1/2 进行线性回归分析,得到 Higuchi 方程,其斜率即为渗透速率 J,单位为

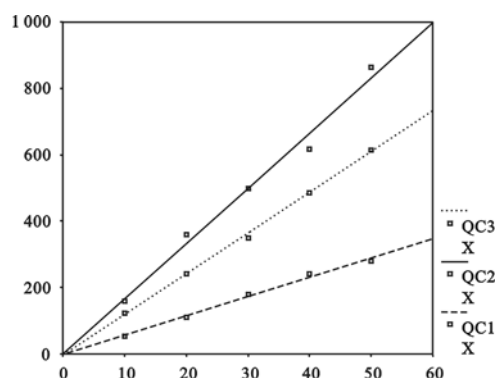
$\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

结 果

在不同实验条件下,各组在不同时间点对应新乌头碱的累积透过量详见表 1, 根据表中数据求得新乌头碱 Q-T 曲线及渗透速率 J ($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$) 分别为: $Q_{\text{自由透皮组}} = 4.168t - 14.253$ ($r = 0.992$), $J = 4.168$; $Q_{\text{超声促透组}} = 6.111t - 3.314$ ($r = 0.998$), $J = 6.111$; $Q_{\text{脉冲电促透组}} = 12.268t - 4.454$ ($r = 0.996$), $J = 12.268$; $Q_{\text{直流电促透组}} = 12.623t + 1.460$ ($r = 0.980$), $J = 12.623$ 。3 组物理干预因子的 Higuchi 统计学回归曲线详见图 1。

表 1 不同实验条件下各组新乌头碱累积透过量比较
($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)

组 别	新乌头碱累积透过量				
	10 min	20 min	30 min	40 min	50 min
自由透皮组	29.5684	71.1204	106.5623	146.3518	200.3623
超声促透组	53.9236	110.9530	180.6259	240.3691	279.3582
脉冲电促透组	124.4154	241.2365	350.2687	486.5914	615.2953
直流电促透组	160.5868	359.8441	499.2891	616.7765	863.2594



注: QC1 表示超声促透组, QC2 表示脉冲电促透组, QC3 表示直流电促透组

图 1 不同物理因子作用下的 Q-t 曲线

各物理因子促透组的渗透速率(J)分别与自由透皮组进行统计学比较, 结果发现超声促透组与自由透皮组间差异无统计学意义($P > 0.05$); 脉冲电促透组及直流电促透组分别与自由透皮组比较, 其差异均有统计学意义($P < 0.05$); 脉冲电促透组与直流电促透组进行比较, 发现两者渗透速率(J)间差异无统计学意义($P > 0.05$)。在实验开始后的 10 ~ 50 min 内, 各组新乌头碱累积透过量(Q)在不同透皮条件下均随时间的延长而持续增加。

讨 论

新乌头碱是含氮的有机化合物, 其分子式为 $\text{C}_{24}\text{H}_{39}\text{NO}_6$ 。在直流电场作用下, 新乌头碱能电离为带正

电子的生物碱离子, 从而具有导电性能, 在电场中自正电极向负电极方向移动^[4]。本实验结果也证实了直流电场的促透效果, 即新乌头碱在直流电作用下的渗透速率是单纯乌头透皮吸收率的 3.03 倍。一般认为恒定的直流电作用于角质层时, 在皮肤中产生的极化电场能对抗原电场, 降低通过皮肤的有效电流, 因此离子导入的效果会随直流电应用时间的延长而降低; 而脉冲电因电场持续时间较短, 被认为能有效抑制极化电场的产生, 从而增强离子导入效果。本实验发现, 恒定直流电的促透作用与脉冲电比较, 其间差异并无统计学意义($P > 0.05$), 可能是因为脉冲电固然可以降低皮肤的极化程度, 但因脉冲频率的缘故, 其有效导电时间减少, 电场作用时间较短, 从而影响了离子的导入量; 并且实验条件、皮肤极化阻抗程度等也对离子导入有所影响, 具体原因还有待于进一步研究探讨。在本实验开始后 10 ~ 50 min 内检测各组新乌头碱的累积透过量, 发现在各实验条件下, 各组新乌头碱累积透过量均随时间延长而持续增加, 其中直流电促透组也未见透皮停止现象发生, 提示在新乌头碱开始透皮后的 50 min 内, 本实验所选用强度的电场作用不会诱发明显的电场出现。这也可能是本实验中脉冲电促透作用与直流电促透作用间差异无统计学意义的原因之一。

声透疗法^[5]是利用压电晶体在接通交流电发生振动后产生超声波能, 使吸收介质产生机械紊乱或改变角质层结构, 从而促进药物吸收, 其作用对象为大分子型药物, 该疗法最大的特点是能在短时间内增加药物的吸收; 与离子导入技术相比, 声透疗法所用药源广泛, 不局限于电离类物质, 药物浓度也不受电离、电解操作限制, 其药用成分亦不容易被电解破坏, 不存在影响治疗效果的强度、时间和极化等问题, 也没有电刺激及电灼伤现象出现。在本研究中, 超声干预未显示出明显促进乌头碱透皮吸收的功效。根据声透疗法原理, 其作用对象以分子型药物为主, 超声促透时改变了富含类脂的角质层结构, 对脂溶性药物尤其对蛋白质和肽类药物的促透效果特别明显。新乌头碱在透皮吸收过程中, 其药物成分主要以带正电的离子形式透过皮肤, 由于新乌头碱离子难以透过富含类脂的角质层, 故可能是超声促透作用不明显的主要原因; 而在直流电作用下, 带正电的乌头碱离子得益于直流电场作用, 加速了其由正极向负极的移动速度, 其透皮效率也就明显增高。

综上所述, 本实验观察了常见物理因子对乌头生物碱透皮吸收的影响作用, 发现超声的促透作用不大, 直流电及脉冲电的促透作用较显著。除此之外, 乌头生物碱的透皮效果还受药物浓度、电离程度等多种因素制约。关于如何选择最佳的乌头透皮条件还需进一

步探讨,以便更好地为临床治疗服务。

参 考 文 献

- [1] 王勇,刘宁. 乌头碱型 C19 去甲二萜生物碱的结构多样性. 中草药,2004,35:350-353.
- [2] 郭万学. 理疗学. 北京:人民卫生出版社,1984,7:30-31.

- [3] 丁立生. 露蕊乌头的二萜生物碱. 药学报,1993,28:1881.
- [4] Hehn B, Fleischer J, Moll F, et al. Pulsed drug penetration through epithelial monolayers of MDCK cells by ultrasound. Pharm Lett, 1995, 37:291-294.

(修回日期:2006-12-28)

(本文编辑:易 浩)

· 短篇论著 ·

超短波并碘离子导入治疗慢性咽炎疗效观察

傅照华 郑桂杰 曹蕾

慢性咽炎为咽黏膜、黏膜下及淋巴组织的慢性炎症,多见于成人^[1],该病治疗方法较多,但疗效不甚理想。我科于2002年1月至2005年12月,应用超短波配合碘离子导入治疗慢性咽炎患者76例,并与单纯采用超短波治疗的患者进行比较分析,现报道如下。

一、对象与方法

(一)研究对象与分组

选择慢性咽炎患者132例,均经专科检查确诊,其中男78例,女54例,吞咽功能正常,空咽时不适感明显,均有不同程度的咽部异物感、烧灼感、发痒或隐痛等。将患者随机分为超短波并碘离子导入组(观察组)76例和单纯超短波治疗组(对照组)56例,2组患者的性别、年龄、病程等比较,差异均无统计学意义($P>0.05$),具有可比性,见表1。

表1 2组患者临床资料比较

组 别	例数	性别 (男/女,例)	年龄 (岁)	病程 (月)
观察组	76	40/36	39.1 ± 11.2	2.8 ± 2.7
对照组	56	38/18	39.6 ± 12.0	3.2 ± 3.2

(二)治疗方法

2组均给予超短波治疗,应用汕头产DL-C型五官超短波电疗机,采用双极法,电极为圆形,直径为70mm,于咽部斜对置,间距1cm,采用微热量。每次治疗15min,每日1次,15d为1个疗程。

观察组于超短波治疗结束后行碘离子导入治疗,采用北京产HY-D型药物离子导入治疗仪,主电极60cm²,衬垫用10%碘化钾溶液均匀浸湿,置于颈前颌下,接阴极,辅电极100cm²,置于颈后,接阳极,电流强度3~12mA,以患者易接受为宜。每日治疗1次,每次20min,15d为1个疗程。

(三)疗效评定标准

2组患者均于治疗1个疗程后观察疗效。痊愈:临床症状消失,咽部黏膜充血及咽后壁淋巴滤泡基本消失;显效:临床症状基本消失,咽部黏膜轻度充血,咽后壁淋巴滤泡明显减少;好转:临床症状减轻,咽后壁淋巴滤泡减少;无效:治疗后临床症状及体征无改变。

(四)统计学分析

采用SPSS 11.5版软件包进行统计分析,组间比较采用 χ^2 检验。

二、结果

观察组痊愈显效率为82.9%,对照组痊愈显效率为46.4%,2组比较,差异有统计学意义($\chi^2 = 19.49, P < 0.05$),见表2。

表2 2组患者疗效观察

组 别	例数	痊愈 (例)	显效 (例)	好转 (例)	无效 (例)	痊愈显 效率(%)
观察组	76	31 ^a	32	11	2	82.9 ^a
对照组	56	7	19	23	7	46.4

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$

三、讨论

慢性咽炎发病原因复杂,受多种因素影响,如急性咽炎或扁桃体炎反复发作、嗜好烟酒、不良生活习惯、有害气体刺激及全身疾病等都可能成为其发病的诱因;其病理表现为咽黏膜慢性充血,黏膜下结缔组织及淋巴组织增生,黏液腺肥大,分泌亢进,慢性肥厚性咽炎可出现广泛的结缔组织及淋巴组织增生,形成咽后壁上颗粒状隆起;临床表现为咽部各种不适感,如异物感、烧灼感、痒感、隐痛等,分泌物刺激可引起刺激性咳嗽,吞咽功能正常,但空咽时不适感明显,咽部症状可因过劳、多语、受寒、烟酒过度及精神刺激等原因而加剧^[1]。超短波的抗炎机制为^[2]:(1)调节酶如 β -葡萄糖醛酸酶的释放;(2)抑制白细胞的活化,减少炎症介质的释放;(3)抑制自由基;(4)使中性粒细胞数增多,吞噬能力增强,并大量释放溶酶体酶。碘离子在直流电的作用下导入咽部组织,可在局部保持较高的浓度,促进慢性炎症的消散^[3];另外,直流电作用还能扩张血管,改善血液循环和组织营养,促进机体新陈代谢^[4]。本研究结果显示,超短波配合碘离子导入治疗慢性咽炎患者疗效明显优于单纯采用超短波治疗的对照组。

参 考 文 献

- [1] 陈景藻. 现代物理治疗学. 北京:人民军医出版社,2001:727.
- [2] 陈红霞,金成兰,李素琴. 超短波抗炎及对细菌作用的国内研究概况与展望. 中华理疗杂志,2002,23:375.
- [3] 乔志恒,范维铭. 物理治疗学全书. 北京:科学技术文献出版社,2001:98.
- [4] 郭新娜,赵波得. 实用理疗技术手册. 北京:人民军医出版社,2000:20.

(修回日期:2007-01-20)

(本文编辑:吴 倩)