

超声波导入的促渗作用及其对皮肤微观结构的影响

楼炜¹, 李新平², 王刚^{3*} (1. 浙江中医药大学附属第三医院药剂科, 杭州 310005; 2. 浙江大学药学院, 杭州 310058; 3. 杭州市第一人民医院药剂科, 杭州 310006)

摘要: 目的 考察超声波导入对高乌甲素水凝胶经皮渗透的促进作用及其对皮肤角质层微细结构的影响。方法 制备了高乌甲素卡波姆凝胶, 分别采用频率为800 kHz和1 MHz的超声波在体外进行了经鼠皮渗透实验, 定时测定接受室药物浓度并计算经皮渗透参数。制备皮肤切片, 分别采用光镜和扫描电镜观察皮肤及角质层微细结构的改变。结果 800 kHz和1 MHz的超声波导入对高乌甲素稳态透皮速率的促渗倍数分别达到约7倍和23倍。角质层微细结构观察发现超声波引起了皮肤表面空隙的增加和结构的改变。结论 超声波导入显著促进了高乌甲素的经皮渗透, 并提示空化效应是引起促渗作用的重要因素。

关键词: 超声波导入; 经皮渗透; 氢溴酸高乌甲素; 凝胶; 角质层

中图分类号: R943.43 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2009)06-0510-04

Sonophoresis Induces the Enhanced Permeation of Drug and Its Effect on Stratum Corneum

LOU Wei¹, LI Xinping², WANG Gang^{3*} (1. Department of Pharmacy, The 3rd Affiliated Hospital, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310005, China; 2. College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China; 3. Department of Pharmacy, The First People's Hospital of Hangzhou, Hangzhou 310006, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the effect of sonophoresis on both the transdermal permeation of lappaconitine hydrobromide and the micro-structure of stratum corneum. **METHODS** Drug-containing gel composed of carbomer 934 was prepared. *In vitro* transcutaneous delivery of lappaconitine hydrobromide with or without sonophoresis which frequencies were 800 kHz and 1 MKz, respectively, were carried out using rat skin and modified Franz diffusion cells. Drug concentration in receive cell was determined at scheduled intervals and the permeation parameters were calculated. The change of skin and stratum corneum after the treatment of sonophoresis was observed by both normal microscope and scanning electric microscope. **RESULTS** Sonophoresis at frequencies of 800 kHz and 1 MHz induced the enhancing rate of drug permeated to about 7-fold and 23-fold, respectively, compared to that of passive diffusion. The surface of stratum corneum was changed by the ultrasound. **CONCLUSION** Sonophoresis can enhance the transdermal permeation of lappaconitine hydrobromide notably and which was probable via the cavitation effect.

KEY WORDS: sonophoresis; transdermal permeation; lappaconitine hydrobromide; gel; stratum corneum

作者简介: 楼炜, 男, 主管药师 Tel: (0571) 88393509 E-mail: louyf112@163.com *通信作者: 王刚, 男, 副主任药师
Tel: (0571)87065701 转 10180 E-mail: 88485534@163.com

超声波导入(sonophoresis)是一种采用超声波(20 kHz~16 MHz)促进药物经皮吸收的物理方法,已有数十年的研究历史。超声波经皮导入的研究在近年取得了长足的发展,从开始仅限于局部药物吸收的研究,发展到促进向药物的系统转运。而近十年来,超声波被广泛用于增加药物以及大分子的经皮吸收,包括蛋白质药物如胰岛素用于治疗糖尿病;低聚核苷酸用于基因的转运;将红细胞生成素透皮给药治疗严重贫血;雌二醇作为替代疗法治疗绝经期妇女以及烟碱用于戒烟等^[1]。

对于超声波的促渗机制,目前已有的研究认为可能包括:致热作用、机械影响、对流运输和空化效应等,而空化效应被认为是其促进药物经皮吸收的主要机制^[2]。

本试验以非成瘾性镇痛药氢溴酸高乌甲素为模型药物,制备其水凝胶剂,考察了不同频率的超声波对其经皮渗透的促进作用,并在此基础上,进一步从微观角度考察了超声波对皮肤角质层微细结构的影响。

1 实验部分

1.1 实验材料、仪器及动物

氢溴酸高乌甲素(兰州仕达生物制品研究所,批号:20061102,纯度>99.9%);卡波姆 934(上海卡乐康公司);聚乙二醇-400(上海浦东高南化工厂);三乙醇胺(无锡海硕生物有限公司);Waters2669高效液相色谱仪(美国 Waters 公司);扫描电子显微镜(SEM-800 型,日本PHILIPS公司);CSL-1型800 kHz超声波治疗仪(上海公共安全器材厂);US-88型1 MHz超声波治疗仪(广东邦图美容设备有限公司);改良 Franz扩散池(自制);501A型超级数显恒温水浴(上海浦东荣丰科学仪器有限公司);RCT-A型磁力搅拌器(杭州利加电器有限公司生产);SD大鼠[雄性,体重(200±20)g,浙江中医药大学实验动物中心提供,SYKK(浙2003-003)]

1.2 药物凝胶的制备

将卡波姆0.1 g均匀撒布于适量水中,静置,使之充分溶胀,将1 g氢溴酸高乌甲素用2 mL乙醇溶解,加入上述基质中,边加边搅拌,再缓慢滴加三乙醇胺,调节pH至6.0~6.5,使其成凝胶状,加水至总量为50 g,搅拌均匀,即可。

1.3 离体鼠皮的制备

取雄性SD大鼠,颈椎脱臼法处死。去鼠毛,剥离去毛部位皮肤。将取下的皮肤平铺于干净的玻璃

板上,角质层朝下。小心剔除皮下的脂肪组织及黏连物,用生理盐水反复冲洗干净,备用。

1.4 体外经皮实验方法

采用改良 Franz 扩散池,将离体鼠皮角质层朝上,将其固定在扩散池的固定片与接受池之间,在角质层上均匀涂布药物凝胶,排尽气泡,循环水温保持(37±0.5)℃。接受池以 20 % PEG400 的生理盐水接受介质,控制 300 r·min⁻¹ 的搅拌速度,每隔一定时间吸取全部接受液,记录体积,并补充等量接受液,采用 HPLC 测定,计算累积渗透量与渗透速率。每个条件均进行 6 次平行实验。

参照文献报道确定色谱条件^[3],具体条件为:迪马 ODS C₁₈柱;柱温:35℃;流动相:0.1 mol·L⁻¹磷酸二氢钠-甲醇(1:1);检测波长:252 nm;流速:1.0 mL·min⁻¹;进样量:20 μL。

1.5 氢溴酸高乌甲素凝胶的经皮超声导入

将离体鼠皮固定于在扩散池的固定片与接受池之间,在皮肤上均匀涂布药物凝胶。将超声波传感探头轻置于皮肤表面。分别使用频率 800 kHz 和 1 MHz,功率为 0.7~0.75 W·cm⁻² 的超声波导入,超声波模式为连续波,导入 10 min 后,撤下超声波,按规定时间取样。

1.6 数据处理

在药物的经皮渗透试验中,一般认为药物通过皮肤的渗透是一个被动扩散的过程,常用 Fick 扩散定律来描述,即将皮肤看作一个均质膜,当药物扩散达到稳态后,其稳态渗透速率的表达式可以写为:

$$J = dQ / dt = \frac{DKC}{h} = P \cdot (C_d - C_r) \approx P \cdot C_d$$

其中:Q 为药物累积渗透量(μg·cm⁻²),t 为时间(h),D 为分配系数,K 为扩散系数(cm²·s⁻¹),h 为膜的厚度,P 为渗透系数(cm·s⁻¹),C_d、C_r 分别为供应室和接受室的药物浓度(μg·mL⁻¹),实验中保持漏槽条件,即 C_d ≫ C_r。

透皮累积渗透量 Q 按下式计算:

$$Q_i = C_i V + \sum_{j=1}^{i-1} C_{j-1} \times V_j$$

式中 V 为接受室体积,V_j 为每次取样体积,C_i 为第 i 次取样时接收液中的药物浓度。

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度 $J_s(\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1})$ 。

1.7 超声波导入对皮肤角质层的结构影响考察

1.7.1 光学显微切片观察 及时剪取对照组皮肤和超声波导入10 min后的离体皮肤样品，用10%福尔马林溶液固定后，按组织切片制作方法处理后，在普通光学显微镜下观察角质层的结构变化。

1.7.2 超微结构观察 剪取对照组皮肤和超声波导入10 min后的离体皮肤样品，用20%戊二醛磷酸溶液固定后，按下述步骤处理：用pH 7.4的磷酸缓冲液冲洗3次，加1%的锇酸固定，依次放入30%，50%，70%，80%，90%，95%，100%乙醇中脱水各10 min，然后将样品移入乙酸异戊酯中，一定时间后取出，在临界点干燥，样品角质层镀金膜，采用SEM-800扫描电镜下观察结构变化。

2 结果

2.1 超声波导入对氢溴酸高乌甲素凝胶经皮吸收的影响

如表1所示，在超声频率800 kHz，强度 $0.75\text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$ ，导入时间为10 min的条件下，氢溴酸高乌甲素的经皮渗透大大增加，其累积透皮渗透

量 $Q_{8\text{hr}}$ 增加了约10倍。而在超声频率为1 MHz时，相比被动扩散，其增渗倍数达到21倍。稳态透皮速率 J_s 的增渗倍数分别为6.5倍和约23倍。结果显示超声波导入能明显增加氢溴酸高乌甲素的经皮渗透，其促渗效果与超声频率有关。

表 1 超声波导入与被动扩散对药物经皮渗透参数的影响 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

Tab 1 Transdermal parameters of lappaconite hydrobromide gel with or without sonophoresis treatment($n=6, \bar{x} \pm s$)

组 别	$J_s/\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$	ER	$Q_{8\text{hr}}/\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$	ER
被动扩散	0.36 ± 0.02	1	3.15 ± 2.67	1
超声波导入(800 kHz)	2.35 ± 0.09	6.53	30.91 ± 9.57	9.81
超声波导入(1 MHz)	8.24 ± 0.08	22.89	64.74 ± 13.56	20.55

注：ER-增渗倍数，与被动扩散组比较

Note: ER-enhancing rate, compared with passive diffusion group

2.2 超声波导入对皮肤角质层微细结构的影响

从普通光镜观察得到，使用频率为 800 kHz 和 1 MHz 的超声波导入 10 min，均未引起皮肤组织结构的明显可见变化，见图 1。但进一步的电镜观察发现。超声波导入前后皮肤表面角质层变化明显，见图 2。对照组皮肤角质层光滑完整，而经两种频率的超声波导入后，皮肤角质层出现疏松，局部有多孔间隙的现象。

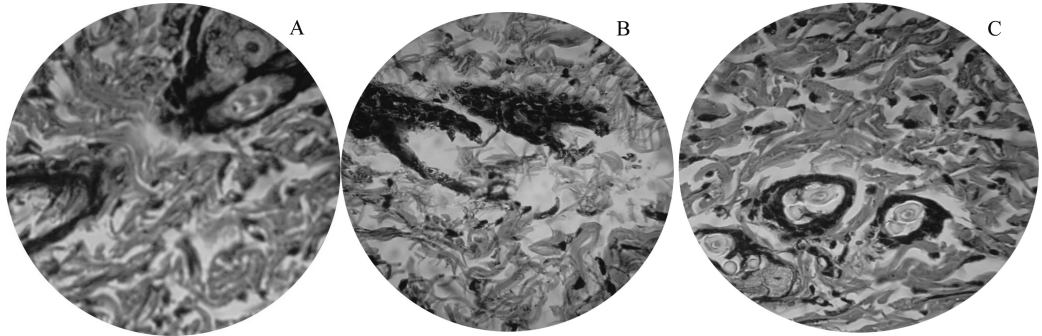


图 1 不同频率超声波导入后的皮肤组织切片图
A-对照组皮肤；B-超声波 800 kHz 导入 10 min；C-超声波 1 MHz，导入 10 min

Fig 1 The histological observation of skin with or without sonophoresis
A-control; B-800 kHz, 10 min; C-1 MHz, 10 min

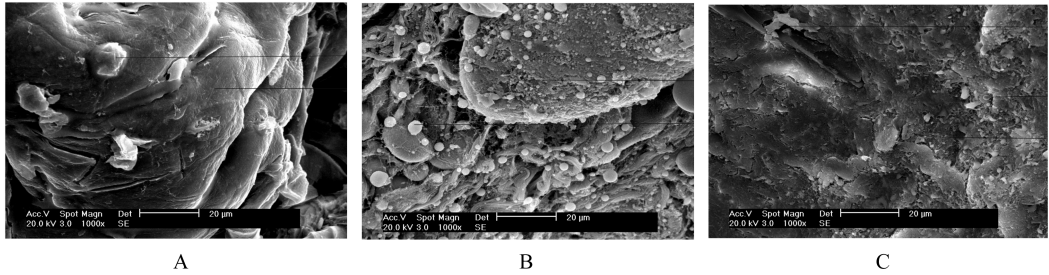


图 2 不同频率超声波导入后皮肤角质层的扫描电子显微镜观察图片
A-对照组皮肤；B-超声波 800 kHz 导入 10 min；C-超声波 1 MHz，导入 10 min

Fig 2 Scanning electron micrographs of rat stratum corneum with or without sonophoresis
A-control; B-800 kHz, 10 min; C-1 MHz, 10 min

3 讨论

本研究的结果证实超声波导入对氢溴酸高乌甲素的经皮渗透有显著的促进作用,而且随着超声频率的提高其作用增强。进一步对皮肤样品经处理进行光镜观察却发现高频条件下,超声波导入并未引起皮肤的角质层、表皮和真皮组织的明显改变,这与文献[4-5]报道相同。但当采用扫描电镜对皮肤切片的角质层进行放大成像时却发现超声波导入后的角质层染色纹理与对照组相比呈现明显差别,并有碎片和空隙的产生。同样的,不同频率作用下皮肤角质层的变化亦不同。已有文献^[6]报道低频超声波导入对药物角质层结构有一定程度的改变。本实验证明中高频的超声波导入同样可能对皮肤角质层会产生空化效应,使角质层出现较多的间隙。

如上所述,认为空化效应在超声波导入中可能产生重要的作用。其可能机制是,超声波的空化效应改变了皮肤角质层的类脂层结构,增加了药物通过角质层内的亲水性通道进入皮肤。同时增加角质层表面结构的空气泡,使角质层表面产生小孔。但从皮肤角质层的组织光学显微镜观察,超声波导入对皮肤组织结构并

没有明显的改变,而且实验中也观察到药物渗透速率在去除超声波导入后随时间延长呈下降趋势,并在约8 h后接近于被动扩散的水平,与文献[5]报道有相似之处,说明超声波导入当其参数控制在一定范围内时其使用是相对安全的。

REFERENCES

- [1] MITRAGOTRI S, BLANKSCHTEIN D, LANGER R. Ultrasound-mediated transdermal protein delivery [J]. *Science*, 1995, 269(5225): 850-853.
- [2] BOMMANNAN D, MENON G K, OKUYAMA H, et al. Sonophoresis. II. Examination of the mechanisms of ultrasound enhanced transdermal drug delivery [J]. *Pharm Res*, 1992, 9(8): 1043-1047
- [3] HAN M, ZHONG Y W, LI X P, et al. Influence of different penetration enhancers on Lappaconitine transcutaneous permeation [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2008, 33(11): 1252-1255
- [4] LEVY D, KOST J, MESHULAM Y, et al. Effect of ultrasound on transdermal drug delivery to rats and guinea pigs [J]. *J Clin Invest*, 1989, 83(6): 2074-2078.
- [5] MITRAGOTRI S, BLANKSCHTEIN D, LANGER R. Transdermal drug delivery using low-frequency sonophoresis [J]. *Pharm Res*, 1996, 13(3): 411-420
- [6] OGURA M, PALIWAL S, MITRAGOTRI S. Low-frequency sonophoresis: Current status and future prospects [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2008, 60(2): 128-133.

收稿日期: 2009-02-06