

综合主成分分析法和皮肤电阻法对几种促透剂促透效果的比较

莫颖诗^a, 陶昊麟^a, 钟景斌^a, 刘文彬^{b,c*}, 王晖^{a*} (广东药科大学, a.中药学院, b.生命科学与生物制药学院, c.广东省生物活性药物研究重点实验室, 广州 510006)

摘要: **目的** 建立一种简单有效的快速评价促透剂透皮吸收促进效果的方法, 并比较综合主成分分析法和皮肤电阻法的促透剂评价结果。**方法** 以氨茶碱作为模型药物, 氮酮、薄荷醇、冰片、油酸及其联用作为促透剂, SD大鼠背部离体皮肤作为渗透屏障, HPLC测定接收液中的药物浓度, 计算累积渗透量、渗透系数、稳态流量、滞后时间和增渗倍数, 运用综合主成分分析法对促透效果进行综合评价; 测定在促透剂作用下的大鼠皮肤电阻随时间的变化, 评价促透剂对皮肤的作用程度。**结果** 用Franz扩散池方法结合综合主成分分析法, 得到对氨茶碱有促透效果的促透剂有油酸加冰片以及薄荷醇, 且油酸加冰片的促透效果大于薄荷醇; 用皮肤电阻法测得有促透作用的是油酸加冰片、薄荷醇加氮酮、薄荷醇、氮酮、油酸、冰片加氮酮以及薄荷醇加冰片, 且作用程度依次递减。采用皮肤电阻法评价的促透效果与采用体外透皮吸收试验评价的结果基本平行($r=0.8869$)。**结论** 综合主成分分析法和皮肤电阻法都可以客观评价促透剂的效果, 且2种方法具有明显的相关性。

关键词: 主成分分析; 皮肤电阻法; 促透剂; 经皮给药; 评价方法

中图分类号: R285.5 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2022)08-1033-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2022.08.005

引用本文: 莫颖诗, 陶昊麟, 钟景斌, 等. 综合主成分分析法和皮肤电阻法对几种促透剂促透效果的比较[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(8): 1033-1038.

Comparison of the Penetration Promoting Effects of Several Transdermal Enhancers by Comprehensive Principal Component Analysis Method and Skin Resistance Method

MO Yingshi^a, TAO Haolin^a, ZHONG Jingbin^a, LIU Wenbin^{b,c*}, WANG Hui^{a*} (Guangdong Pharmaceutical University, a.School of Traditional Chinese Medicine, b.School of Life Sciences and Biopharmaceutics, c.Guangdong Provincial Key Laboratory of Pharmaceutical Bioactive Substances, Guangzhou 510006, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop a simple and effective method to efficiently assess the effect arising from transdermal absorption of the penetration enhancer, and to compare the effect of the penetration enhancer assessed using the comprehensive principal component analysis method and the skin resistance method. **METHODS** In this study, aminophylline was adopted as a model drug, and azone, menthol, borneol, oleic acid and their combination were employed as the permeation enhancers. The isolated back skin of SD rats was applied as a permeation barrier. The drug concentration in the receiving solution was measured using HPLC. Moreover, cumulative permeability, permeability coefficient, steady flow rate, lag time and infiltration multiple were calculated, and the effect of permeability promotion was comprehensively assessed through a principal component analysis. The changes of skin resistance over time were measured to assess the effect arising from penetration enhancers on skin. **RESULTS** The results were achieved using the Franz diffusion cell method combined with the comprehensive principal component analysis method, indicating that oleic acid plus borneol and menthol had a penetration promoting effect on aminophylline, and the penetration promoting effect of oleic acid and borneol was higher than that of menthol. The penetration promoting substances measured by skin resistance included oleic acid plus borneol, menthol plus azone, menthol, azone, oleic acid, borneol plus azone and menthol plus borneol, and the effect degree decreased in descending order. The penetration promotion effect assessed by the skin resistance method was basically parallel to that assessed through the *in vitro* transdermal absorption experiment($r=0.8869$). **CONCLUSION** Both the integrated principal component analysis method and the skin resistance kinetics method are found to be capable of objectively assessing the effect of the penetration enhancer, and the two methods are obviously correlated with each other.

KEYWORDS: principal component analysis; skin resistance method; penetration enhancer; transdermal administration; evaluation method

如何促进药物透过皮肤角质层进入体内发挥药效, 是经皮给药系统(transdermal drug delivery systems, TDDS)需要解决的关键问题^[1]。目前最常

用的方法是添加合适的促透剂, 以离体皮肤扩散池方法来评价体外透皮促渗能力。该方法主要通过求算药物累积渗透量、渗透系数、增渗倍数、

基金项目: 国家自然科学基金项目(81072591)

作者简介: 莫颖诗, 女, 硕士生 E-mail: 1292397488@qq.com
王晖, 男, 硕士, 教授 E-mail: gdwanghui2006@126.com

*通信作者: 刘文彬, 男, 博士, 教授 E-mail: 408011126@qq.com

滞后时间及稳态流量等参数来评价促透剂的促渗能力^[2]。由于评价指标的多样性,使得普通方法难以直接准确地评价促透效果,将多种指标综合起来评价是比较合理且可靠的方法。

在综合评价方法中,主成分分析法(principal component analysis, PCA)是一种常用的多元统计分析方法。其基本思想是用一组新的无相关性的综合指标,代替原来具有一定线性相关性的多个指标,从而尽可能多地反映原指标信息,用得到的综合指标来评价原来的多指标数据^[3]。该方法可以消除评价指标之间的相互影响,减少选择指标的工作量。该方法在保留绝大部分信息的情况下,用少数几个综合指标代替原有指标进行分析,确定权重客观合理并且计算方法较为规范,可以利用专门的软件简化计算流程。用PCA评价促透剂的效果,可以从根本上解决指标间的信息重叠问题,同时大大简化原指标体系的结构。而且,在PCA中,各综合因子的权重不是人为确定的,而是根据综合因子的贡献率大小确定的。这使综合评价结果唯一且客观合理。

皮肤电阻是指皮肤表面角质层的电阻,主要取决于皮肤角质层的厚度及排列方式。促透剂可以通过促进角质细胞重排来降低皮肤电阻,一般认为其下降幅度与促透剂效果呈正相关^[3],因此皮肤电阻测定可以考察促透剂对皮肤屏障的影响,从而对促透剂的促透效果做出评价。皮肤电阻测定仅需要1 h即可完成,而且还可以用于评价促透剂作用的可逆性,已被广泛应用于评价离体皮肤的屏障功能,并且也可以作为筛选促透剂的有效方法,在促透剂评价中有广阔的应用前景。因此,本研究使用PCA和皮肤电阻法对几种促透剂的促透效果进行比较,并计算2种方法之间的相关性,为促透剂的客观评价寻找更简便的方法。

1 材料

1.1 动物

SPF级SD大鼠,♂,体质量200~240 g,由广东省医学实验动物中心提供,批号:44007200095380;生产许可证号:SCXY(粤)2018-0002。本实验的伦理编号为gdpulacspf2017380,本实验过程中一切操作都符合动物伦理学,实验单位使用许可证号:SYXK(粤)2017-0125。

1.2 试剂

氨茶碱(上海源叶生物科技有限公司,批号:SAO814GB13;纯度:HPLC≥98%);氮酮(新乡高

金药业有限公司,批号:20180710);冰片(国药集团化学试剂有限公司,批号:F20191121);油酸(天津市福晨化学试剂厂,批号:20180520);薄荷醇(上海晶纯生化科技股份有限公司,批号:M107059);生理盐水(辰欣药业股份有限公司,批号:2019220721);甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

1.3 仪器

LC-20A型高效液相色谱仪(日本岛津);AE240型电子分析天平(梅特勒-托利多仪器有限公司);TK-24BL型透皮扩散试验仪(上海锴凯科技贸易有限公司);Transwell装置(上海玉博科技有限公司);RE1600上皮细胞电压电阻仪(北京金工鸿泰科技有限公司)。

2 方法

2.1 皮肤接收液中氨茶碱的含量测定

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取氨茶碱对照品50 mg,置于50 mL量瓶中,加生理盐水定容,得1 mg·mL⁻¹氨茶碱对照品溶液。

2.1.2 色谱条件 Diamonsil C₁₈色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm);流动相为甲醇-水(40:60);流速:0.8 mL·min⁻¹;检测波长:275 nm;柱温:20℃;进样量:10 μL。

2.1.3 标准曲线的绘制 精密量取“2.1.1”项下氨茶碱对照品溶液,用生理盐水分别稀释成0.5, 1, 2, 5, 10, 50 μg·mL⁻¹,按“2.1.2”项下色谱条件测定其峰面积,以峰面积为纵坐标,浓度为横坐标进行线性回归,得标准曲线方程 $y=29\,942.0x-9\,024.3$, $R^2=0.999\,9$,浓度在0.5~50 μg·mL⁻¹内的线性关系良好。

2.1.4 精密度试验 精密量取“2.1.1”项下氨茶碱对照品溶液,加生理盐水稀释成1, 5, 50 μg·mL⁻¹的溶液,1 d内进样5次,按“2.1.2”项下的色谱条件测定,计算得氨茶碱峰面积的RSD值分别为2.5%, 3.9%, 1.2%,表明氨茶碱日内精密度良好。

上述1, 5, 50 μg·mL⁻¹的氨茶碱溶液,3 d内每天进样1次,按“2.1.2”项下的色谱条件测定,计算得氨茶碱峰面积的RSD为1.3%, 1.2%, 0.8%,表明氨茶碱日间精密度良好。

2.1.5 加样回收率试验 精密吸取1 mg·mL⁻¹氨茶碱对照品溶液0.05, 0.10, 0.15 mL各3份,分别置于10 mL量瓶中,再加入0.1 mg·mL⁻¹氨茶碱溶液1 mL,加生理盐水稀释至刻度,按“2.1.2”项下色谱条件测定,计算氨茶碱的平均加样回收率为103.4%,RSD为0.4%。

2.2 透皮吸收试验

2.2.1 离体皮肤的制备 将大鼠背部及两侧的皮肤使用脱毛膏处理 2~3 min, 再用生理盐水冲洗干净。2 h 后处死大鼠并剥离其背部皮肤, 去除脂肪组织、血管, 用生理盐水反复冲洗干净至无浑浊, 擦干, 用保鲜膜包好, 置于冰箱-20℃冷冻保存。

2.2.2 释放液和接收液的制备 以 70%乙醇为溶剂, 制成不含促透剂、含 1%氮酮、含 1%薄荷醇、含 1%冰片、含 1%油酸、含 1%薄荷醇和 1%油酸、含 1%薄荷醇和 1%冰片、含 1%油酸和 1%冰片 8 种含 $10\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 氨茶碱的释放液, 接收液为生理盐水。

2.2.3 体外透皮试验^[4] 将“2.2.1”项下制得的离体皮肤常温解冻, 在双室透皮扩散装置进行体外透皮试验。离体皮肤固定在样品池与接收池之间, 角质层面向样品池, 接收池注入 5.0 mL 接收液, 样品池注入 0.1 mL 释放液, 实验温度为 $(32.0\pm 1.0)^{\circ}\text{C}$, 振速为 $120\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 扩散面积为 0.502 cm^2 。在 2, 4, 8, 12, 24 h 分别取接收液 4.0 mL(每次取样后补回等量生理盐水), 用“2.1.2”项下色谱条件测定峰面积, 计算氨茶碱的累计渗透量 Q 。

$$Q = \frac{VC_n + V' \sum_{i=1}^{n-1} C_i}{A}$$

式中 C_n 为 n 时间点的药物浓度, C_i 为 i 时间点的药物质量浓度, V 为接受液体积, V' 为取样量, A 为扩散渗透面积。将 Q 对时间 t 进行线性拟合, 得到方程 $Q = J_{\text{ss}}t - J_{\text{ss}} \times T_{\text{lag}}$, 该直线斜率即为稳态流量 J_{ss} , T_{lag} 为滞后时间。药物渗透系数 $K_p = J_{\text{ss}}/C$, C 为接收池中药物浓度。增渗倍数 $\text{ER} = K_p/K_{\text{p0}}$, K_{p0} 为药物固有渗透系数, 即无促透剂组的 K_p 。

2.3 皮肤电阻动力学测定^[5]

将离体皮肤固定于 Transwell 装置 24 孔嵌套板, 角质层朝向样品池, 给药皮肤面积为 0.33 cm^2 。皮肤下层加入 0.65 mL PBS, 上层加入 0.2 mL 含促透剂的溶液(溶剂为 70%乙醇), 无促透剂组加入等体积的空白溶剂。将 24 孔嵌套板置于 37°C 恒温水浴中, 插入电极(图 1), 平衡数秒后读取电阻值, 即为初始电阻(R_0), 并于给药后 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 40, 60 min 读取电阻值, 即为 R_t , 以初始电阻与 t 时电阻比值(R_0/R_t)对时间作图, 并对曲线中直线部分进行线性回归, 得直线斜率 K , 即为衡量促透剂效果的参数, 按公式计算 ER 值: $\text{ER} = K_{\text{促透剂}}/K_{\text{空白}}$ 。整体装置见图 2。

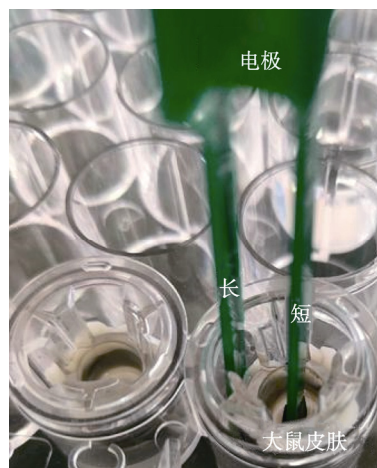


图 1 细胞电阻仪电极测量大鼠皮肤电阻

Fig. 1 Cell resistance meter electrode measuring rat skin resistance



图 2 细胞电阻仪和 Transwell 装置

Fig. 2 Cell resistance meter and Transwell device

2.4 数据的统计学处理

利用 SPSS 25.0 软件对数据进行统计分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 t 检验分析, 相关性分析应用进行 Spearman 相关检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 促透剂对氨茶碱透皮参数的影响

由表 1 可见, 无促透剂组的累积渗透量大于其他促透剂组, 24 h 累积渗透量的大小顺序为无促透剂组 > 1%油酸 + 1%冰片组 > 1%薄荷醇组 > 1%氮酮组 > 1%冰片组 > 1%油酸组 > 1%薄荷醇 + 1%冰片组 > 1%薄荷醇 + 1%油酸组。

渗透系数(K_p)、稳态流量(J_{ss})和增渗倍数(ER)等参数与透皮吸收效果成正比, 滞后时间(T_{lag})与透皮吸收效果成反比, 由表 2 可见, 无促透剂组的透皮吸收效果最好, 1%油酸 + 1%冰片组、1%薄荷醇组和 1%氮酮组次之, 1%油酸组和 1%冰片组再次之, 1%薄荷醇 + 1%油酸组 1%薄荷醇 + 1%冰片组的透皮吸收效果最差。

表 1 促透剂对氨茶碱不同时间累积渗透量的影响($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Tab. 1 Effect of penetration enhancers on the cumulative penetration of aminophylline in different time($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

组别	累积渗透量/ $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$				
	2 h	4 h	8 h	12 h	24 h
无促透剂组	16 508.88 $\pm$ 2 233.57	17 170.00 $\pm$ 9 317.18	25 127.48 $\pm$ 9 016.51	31 459.96 $\pm$ 8 631.83	48 902.68 $\pm$ 7 508.81
1%氮酮组	3 633.17 $\pm$ 920.40	6 541.01 $\pm$ 1 348.12	10 750.96 $\pm$ 2 679.24	16 562.36 $\pm$ 4 175.31	26 802.10 $\pm$ 11 072
1%薄荷醇组	4 958.33 $\pm$ 3 578.29	9 120.24 $\pm$ 2 610.71	11 920.35 $\pm$ 3 432.69	19 368.65 $\pm$ 7 276.80	32 265.35 $\pm$ 15 338.18
1%油酸组	3 452.48 $\pm$ 980.77	6 321.22 $\pm$ 1 164.15	8 895.52 $\pm$ 778.49	13 480.20 $\pm$ 1 293.81	20 595.00 $\pm$ 4 022.69
1%冰片组	2 722.44 $\pm$ 556.64	6 317.53 $\pm$ 1 891.01	9 152.48 $\pm$ 2 789.24	16 258.73 $\pm$ 7 310.54	23 660.82 $\pm$ 13 246.91
1%薄荷醇+1%油酸组	3 450.61 $\pm$ 1 175.89	5 623.25 $\pm$ 1 755.25	10 460.48 $\pm$ 3 416.83	13 665.84 $\pm$ 4 002.13	16 346.68 $\pm$ 4 687.27
1%薄荷醇+1%冰片组	3 237.85 $\pm$ 1 373.51	7 478.03 $\pm$ 4 625.38	9 381.89 $\pm$ 4 725.71	12 126.53 $\pm$ 4 799.38	17 338.26 $\pm$ 10 548.44
1%油酸+1%冰片组	7 798.16 $\pm$ 7 154.07	14 066.81 $\pm$ 4 808.51	20 742.00 $\pm$ 5 949.86	28 301.26 $\pm$ 6 110.89	42 229.71 $\pm$ 3 170.94

表 2 促透剂对氨茶碱透皮吸收参数的影响($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Tab. 2 Effects of penetration enhancers on the transdermal absorption parameters of aminophylline($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

组别	$J_{ss}/\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-1}$	T_{lag}/h	$K_p/\text{cm}\cdot\text{h}^{-1}$	ER
无促透剂组	1 521.40 $\pm$ 282.60	-9.45 $\pm$ 10.06	0.36 $\pm$ 0.06	1.00
1%氮酮组	1 047.84 $\pm$ 520.82	-3.35 $\pm$ 3.27	0.25 $\pm$ 0.12	0.69
1%薄荷醇组	1 224.43 $\pm$ 635.78	-3.73 $\pm$ 3.17	0.29 $\pm$ 0.15	0.80
1%油酸组	763.00 $\pm$ 197.32	-4.38 $\pm$ 3.21	0.18 $\pm$ 0.05	0.50
1%冰片组	940.07 $\pm$ 594.20	-4.23 $\pm$ 4.46	0.22 $\pm$ 0.14	0.62
1%薄荷醇+1%油酸组	572.10 $\pm$ 260.88	-8.65 $\pm$ 5.30	0.14 $\pm$ 0.06	0.38
1%薄荷醇+1%冰片组	583.73 $\pm$ 359.18	-7.59 $\pm$ 1.63	0.14 $\pm$ 0.08	0.38
1%油酸+1%冰片组	1 511.71 $\pm$ 351.91	-5.77 $\pm$ 6.12	0.36 $\pm$ 0.08	0.99

3.2 PCA^[6]分析促透剂对氨茶碱经皮渗透的影响

3.2.1 相关系数矩阵的变化 用 SPSS 25.0 软件对原始数据矩阵进行标准化变换($Z_{i \times j}$)(表 3), 再对标准化阵 Z 求得 4 个变量的相关系数阵 $R=(r_{ij})$, 结果见表 4。

表 3 促透剂对氨茶碱经皮渗透影响的标准化变化矩阵

Tab. 3 Standardized change matrix of the effects of various penetration enhancers on the transdermal penetration of aminophylline

组别	$J_{ss}/\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-1}$	T_{lag}/h	$K_p/\text{cm}\cdot\text{h}^{-1}$	ER
无促透剂组	1.326	-1.502	1.350	1.334
1%氮酮组	0.072	1.072	0.113	0.081
1%薄荷醇组	0.540	0.911	0.562	0.526
1%油酸组	-0.682	0.637	-0.675	-0.687
1%冰片组	-0.213	0.700	-0.225	-0.202
1%薄荷醇+1%油酸组	-1.186	-1.165	-1.125	-1.173
1%薄荷醇+1%冰片组	-1.156	-0.717	-1.125	-1.173
1%油酸+1%冰片组	1.300	0.051	1.350	1.294

表 4 促透剂对氨茶碱经皮渗透影响的相关系数矩阵

Tab. 4 Correlation coefficient matrix of the effects of various penetration enhancers on aminophylline percutaneous dialysis

指标	$J_{ss}/\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-1}$	T_{lag}/h	$K_p/\text{cm}\cdot\text{h}^{-1}$	ER
$J_{ss}/\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-1}$	4.948	0.191	4.898	4.935
T_{lag}/h	0.191	4.902	0.142	0.178
$K_p/\text{cm}\cdot\text{h}^{-1}$	4.898	0.142	4.850	4.884
ER	4.935	0.178	4.884	4.922

3.2.2 主成分的确定 计算氨茶碱相关系数矩阵的特征值和方差贡献率, 结果见表 5, 结果显示氨

茶碱组的成分 1 和成分 2 的贡献率分别为 75.034% 及 24.956%, 两者累计贡献率为 99.998%; 根据特征值的信息贡献率和累计贡献率, 以及氨茶碱主成分分析的碎石图(图 3), 确定氨茶碱组的主成分为成分 1 和成分 2, 该主成分代表了促透剂对氨茶碱经皮渗透的影响信息。

表 5 促透剂对氨茶碱经皮渗透影响的特征值和方差贡献率

Tab. 5 Characteristic value and variance contribution rate of the influence of various penetration enhancers on the transdermal penetration of aminophylline

成分	特征值	方差贡献率/%	累积贡献率/%
1	3.001	75.034	75.034
2	0.998	24.956	99.990
3	0	0.009	99.998
4	0.000 062	0.002	100.000

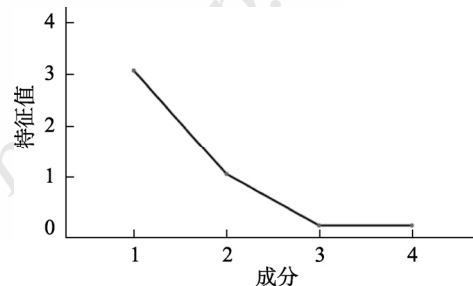


图 3 促透剂作用的主成分分析法碎石图

Fig. 3 Lithotripsy diagram of the principal component analysis method of aminophylline

3.2.3 主成分特征向量的计算 从初始因子载荷矩阵计算出氨茶碱 2 个主成分的特征向量矩阵(表 6), 这 2 个主成分与各变量的标准值的线性组合分别为 $F_1=0.333 \times \text{稳态流量} + 0.017 \times \text{滞后时间} + 0.333 \times \text{渗透系数} + 0.333 \times \text{增渗倍数}$; $F_2=(-0.013) \times \text{稳态流量} + 1.000 \times \text{滞后时间} + (-0.023) \times \text{渗透系数} + (-0.016) \times \text{增渗倍数}$ 。

表 6 促透剂对氨茶碱经皮渗透影响的主成分特征向量

Tab. 6 Principal component characteristic vectors of the effects of various penetration enhancers on the transdermal penetration of aminophylline

成分	$J_{ss}/\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-1}$	T_{lag}/h	$K_p/\text{cm}\cdot\text{h}^{-1}$	ER
1	0.333	0.017	0.333	0.333
2	-0.013	1.000	-0.023	-0.016

3.2.4 主成分得分及综合得分的计算 将处理后的各变量的标准化数据代入线性组合方程,求主成分分析的得分 F_1 和 F_2 ,并计算综合得分 $F=75.034\%F_1+24.956\%F_2$,根据综合得分进行排序,结果见表 7。

表 7 促透剂对氨茶碱经皮渗透影响的主成分得分和综合得分
Tab. 7 Principal component scores and comprehensive scores of the effects of various penetration enhancers on the transdermal penetration of aminophylline

组别	F_1	F_2	F	F 排序
无促透剂组	1.309 8	-1.571 7	0.590 5	3
1%氮酮组	0.106 7	1.066 9	0.346 3	4
1%薄荷醇组	0.557 5	0.883 0	0.638 8	2
1%油酸组	-0.669 8	0.672 5	-0.334 8	6
1%冰片组	-0.201 3	0.711 6	0.026 6	5
1%薄荷醇+1%油酸组	-1.180 1	-1.104 5	-1.161 1	8
1%薄荷醇+1%冰片组	-1.162 3	-0.657 67	-1.036 2	7
1%油酸+1%冰片组	1.314 2	-0.018 0	0.981 6	1

由表 7 的 F 排序可见,促透剂对氨茶碱的经皮渗透影响大小顺序为油酸加冰片>薄荷醇>无促透剂>氮酮>冰片>油酸>薄荷醇加冰片>薄荷醇加油酸。表明油酸加冰片、薄荷醇对氨茶碱都有明显促透作用,其中促透效果最好的是油酸加冰片。

3.3 皮肤电阻测定结果

不同促透剂处理离体皮肤后,只有空白溶剂的初始电阻 R_0 与各组的皮肤电阻 R_t 的比值随时间的变化结果见图 4。将曲线中直线部分进行线性回归,线性回归方程的斜率即为促透剂的渗透系数 $K_{电阻}$,按照公式 $ER=K_{促透剂}/K_{空白}$ 来计算电阻增渗倍数 $ER_{电阻}$ 值,结果见表 8。对皮肤电阻测定结果进行分析,结果表明,与空白组对比,氮酮、薄荷醇、油酸、薄荷醇加氮酮、油酸加氮酮、冰片加氮酮、油酸加冰片对皮肤电阻的影响存在极

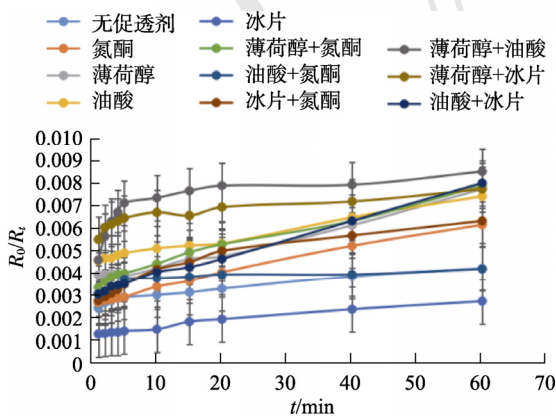


图 4 促透剂处理后大鼠离体皮肤电阻变化时间曲线 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Fig. 4 Time curve of the resistance change of rat isolated skin after treatment with different penetration enhancers ($\bar{x} \pm s, n=5$)

表 8 促透剂处理后大鼠皮肤电阻变化结果 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Tab. 8 Results of resistance changes in rat skin resistance after treatment with different penetration enhancers ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	$K_{电阻}/\% \cdot \min^{-1}$	$ER_{电阻}$
无促透剂组	0.248±0.056	1.00
1%氮酮组	0.607±0.057 ¹⁾	2.45
1%薄荷醇组	0.693±0.041 ¹⁾	2.79
1%油酸组	0.472±0.050 ¹⁾	1.90
1%冰片组	0.246±0.031	0.99
1%薄荷醇+1%氮酮组	0.693±0.021 ¹⁾	2.91
1%油酸+1%氮酮组	0.084±0.013 ¹⁾	0.34
1%冰片+1%氮酮组	0.434±0.023 ¹⁾	1.75
1%薄荷醇+1%油酸组	0.241±0.022	0.97
1%薄荷醇+1%冰片组	0.262±0.026	1.06
1%油酸+1%冰片组	0.820±0.057 ¹⁾	3.30

注:与无促透剂组比较, ¹⁾ $P<0.01$ 。

Note: Compared with no penetration enhancer group, ¹⁾ $P<0.01$.

显著差异($P<0.01$)。由表 8 的电阻增渗倍数可见,几种促透剂的经皮渗透影响大小顺序为油酸加冰片>薄荷醇加氮酮>薄荷醇>氮酮>油酸>冰片加氮酮>薄荷醇加冰片>无促透剂>冰片>薄荷醇加油酸>油酸加氮酮。

将以上促透剂通过 Franz 扩散池的体外透皮吸收实验测定所得的 ER 值与通过皮肤电阻动力学测定所得的 ER 值进行线性拟合,结果见图 5。可见两者之间有明显的相关性($r=0.886 9$),说明皮肤电阻测定的结果与 Franz 扩散池方法的体外透皮吸收测定结果具有很好的相关性。

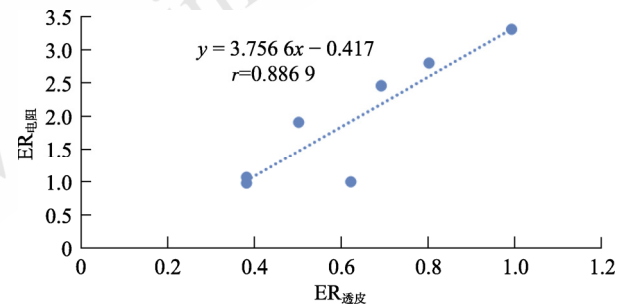


图 5 促透剂 $ER_{电阻}$ 与 $ER_{透皮}$ 的线性拟合图

Fig. 5 Linear fitting of $ER_{resistance}$ and $ER_{transducthelium}$

4 讨论

添加促透剂后的皮肤累积渗透量降低,原因可能是促透剂的浓度过低。促透剂浓度一般在 1%~3%成剂量效应关系,达到一定浓度促透作用不会再增强,促透剂低于一定浓度时,皮肤累积渗透量可能会比无促透剂时更低。

评价体外透皮促渗能力所用的扩散池方法是指将离体皮肤固定在扩散池上,定时取接收液,用适宜的分析方法测定有效成分的含量,从而评价化学物的渗透特性。Franz 扩散池方法所运用的评价方法为主成分分析法,简化复杂的数据处理,

在保证精确度的前提下提高效率^[7]。如果综合得分为正数,说明该主成分的水平在平均值之上,且得分越高,促透效果越强,反之亦然。再依据综合得分进行排名,对促透剂的促透水平做出评价。但扩散池方法存在费时、对皮肤要求高、重复性较差且计算过程繁琐的缺点,为了提高效率,同时选择更简便快捷的皮肤电阻动力学方法来评价皮肤的渗透效果,并比较 2 种方法得到的结果,以考察皮肤电阻法能否代替扩散池方法评价促透剂的效果。

Franz 扩散池方法通过模拟皮肤的在体情况来判断药物的透皮吸收效果。而促透剂对皮肤促渗作用大多通过改变角质层中脂质的流动性来改变角质层的通透性。皮肤角质层是影响皮肤透过性的重要结构,由角质细胞和脂质组成,是多层致密的膜结构,二者共同维持皮肤正常的屏障功能。角质细胞间排列紧密,对水分及一些化学物质具有屏障作用,防止水分的蒸发。同时,皮肤角质层细胞的排列方法和紧密连接蛋白的表达形式共同决定着皮肤电阻的大小。皮肤表面内有极性的生物膜结构,使皮肤成为具有高度隔室的组织,由生物膜作为边界形成的微小解剖结构相当于电容。正常健康的皮肤电阻可 $>20\text{ k}\Omega$,而皮肤角质层受到干扰时,电阻便急剧下降。Davies 等^[8]研究发现,在 0.5, 6 h 下进行的皮肤电阻测量,所测得的 ER 非常相似。Franz 扩散池方法和皮肤电阻法都与皮肤角质层的状态紧密关联,这是 2 种方法有较高相关性的原因。由此证明相比扩散池方法,皮肤电阻法不仅计算方便、操作简单,且可节省大量的时间,已经成为了一种简便实用的促透剂评价方法^[5],为进一步阐明促透剂对皮肤的作用机制提供依据。

一般认为,离体皮肤电阻变化时间曲线可以研究促透剂对皮肤角质层和紧密连接的作用程度^[9]。促透剂发挥作用后,离体皮肤电阻显著下降。氮酮的曲线呈稳定上升趋势,冰片加氮酮、薄荷醇加氮酮与单用氮酮的曲线趋势相似,表明氮酮的促透效果可维持较长时间,但起效较慢。氮酮单用或与薄荷醇、冰片联用都有较好的促透效果,但与油酸联用的促透效果不明显。油酸单用时,皮肤电阻变化时间曲线的趋势一开始较为平稳,随后稳定上升,表示其发挥促透作用需要一定时间,促透效果随时间稳步增强;加入冰片后的曲线上升趋势明显,表明其促透效果十分显著,且

起效时间快。冰片的曲线没有明显的上升趋势,表示其单用时的促透效果一般。而冰片与其他促透剂联用时电阻下降的幅度比单独使用冰片更大,表明冰片联用时皮肤渗透效果更强。薄荷醇与油酸和冰片联用时,皮肤电阻变化曲线在前 5 min 较为陡峭,随后平缓,表明薄荷醇和油酸、薄荷醇和冰片起效快,且持续时间长,促透效果稳定。上述结果提示,皮肤电阻动力学方法可以作为研究促透剂效果的手段。

本实验的药物适用范围为水溶性药物,如氨茶碱、对乙酰氨基酚、水杨酸等。关于促透剂对脂溶性药物的透过情况,还要做进一步的研究。本实验运用 Franz 扩散池方法和皮肤电阻动力学方法从药物透过量 and 皮肤电阻的变化这 2 个方面来评价并比较促透剂效果,2 种方法得到促透剂的促透结果有较高的相关性,因此判断皮肤电阻法可以代替传统经典的扩散池方法来评价促透剂的效果,为促透剂的筛选提供了新思路。

REFERENCES

- [1] 刘基,王媚,王露,等. 经皮给药系统研究进展[J]. 现代中医药, 2018, 38(6): 156-159.
- [2] LAN Y, YANG L, SHI D Y, et al. *In vivo* transdermal penetration enhancing activity of essential oil from Zanthoxyli Pericarpium by using microdialysis technique[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2017, 42(14): 2676-2682.
- [3] LUO F Y, ZHANG L Y, HUANG X L, et al. Application of transcutaneous electrical resistance test method in cosmetics safety evaluation[J]. J Food Saf Qual(食品安全质量检测学报), 2018, 9(18): 4812-4815.
- [4] SHENG P, XIAO H R, YE Q Y, et al. Study on the evaluation of several transdermal enhancers' effect by the entropy weights combined with equivalent numerical methods[J]. J Guangdong Pharm Univ(广东药科大学学报), 2017, 33(5): 585-589.
- [5] REN L, CHEN J Y, YAO J H, et al. Comparative study on the transdermal penetration enhancement effect of essential oils of interior-warming drugs based on electrical resistance of skin[J]. J Nanjing Univ Tradit Chin Med(南京中医药大学学报), 2018, 34(5): 474-479.
- [6] WU S Y, FENG Y N, WANG H. The comprehensive evaluation of the penetrating effect of penetrators with principal component analysis[J]. J Guangdong Pharm Univ(广东药科大学学报), 2017, 33(2): 153-157.
- [7] WANG P, KUANG F M, DEND Y W, et al. Assessment of land Eco-security of the Hengyang city on the principal component[J]. Eco Geo(经济地理), 2015, 35(1): 168-172.
- [8] DAVIES D J, WARD R J, HEYLINGS J R. Multi-species assessment of electrical resistance as a skin integrity marker for *in vitro* percutaneous absorption studies[J]. Toxicol In Vitro, 2004, 18(3): 351-358.
- [9] HU X Q. Mechanism of repairing skin barrier by osthole via Akt/ZO-3 signaling pathway[D]. Nanjing: Nanjing University of Chinese Medicine, 2020.

收稿日期: 2022-01-08

(本文责编: 蔡珊珊)