

pH 值及皮肤角质层对乌头生物碱 直流电离子导入量的影响

岳寿伟¹ 殷翠萍¹ 王晓聆²

摘要 目的:比较不同 pH 及去角质皮肤条件下乌头生物碱的体外透皮吸收情况。方法:成年大鼠 28 只,随机分 4 组 (n=7):pH4.0 完整皮肤组,pH7.0 完整皮肤组,pH9.0 完整皮肤组,pH4.0 去角质层皮肤组。取含乌头生药 3g/ml 浓度的提取液作为释放液,各组均采用 0.1mA/cm² 直流电导入作为促透因素,在设定条件下行离体透皮吸收,并均在实验开始后 10min、20min、30min、40min、50min 于接受液取样。高效液相色谱法建立新乌头碱的峰值-含量标准曲线,并测定不同时间点取样溶液中新乌头碱含量,通过计算新乌头碱累积透过量-时间曲线图求得各组透皮速率。结果:当 pH 值为 4.0、7.0、9.0 时,新乌头碱通过完整皮肤的透皮吸收率分别为 12.623、4.916、3.121,差异有显著性意义;当 pH 值为 4.0 时去角质层皮肤的新乌头碱透皮速率是未去角质层的 9.60 倍。6% 乌头溶液中新乌头碱浓度为 0.00319%。结论:在 pH4.0—9.0 的缓冲条件下,乌头碱的直流电促透皮量随 pH 的下降而增加;去角质条件下直流电导入的新乌头碱的量明显高于完整皮肤条件下的导入量;临床用 6% 乌头溶液的透皮吸收安全有效。

关键词 体外透皮吸收;新乌头碱;pH 值;角质层

中图分类号:R493,R454 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2006)-10-0887-03

Effects of different pH buffer solution and corneum on the absorption of Aconitum alkaloids introduced by direct current in vitro/YUE Shouwei,YIN Cuiping,WANG Xiaoling/Chinese Journal of Rehabilitation Medicine,2006,21(10):887—889

Abstract Objective:To study the effects of different pH buffer solutions and the corneum on the transcutaneous permeability of Aconitum alkaloids in vitro.**Method:**Twenty-eight adult rats were randomly divided into four teams (n=7),each team with different transcutaneous absorptive condition:pH 4.0 buffer solution and normal skin; pH7.0 buffer solution and normal skin;pH9.0 buffer solution and normal skin;pH4.0 buffer solution and corneum-moved skin. R. aconiti was extracted and the solution with 3g/ml aconiti was obtained. Using this solution and 0.1mA/cm² direct current as absorption facilitating factor delivery solution for the transcutaneous absorption of Aconitum alkaloids in vitro, with different conditions above. From the beginning of absorption, samples were collected from receiving solution at 10min、20min、30min、40min、50min, separately.A peak area-content standard curve of mesaconitine was established through the high performance liquid chromatography method.Thus,the contents of mesaconitine were determined of all samples.Calculating accumulative permeation quantity at each correspond time. So the percutaneous speeds were obtained from Q-t curves.**Result:**When the pH value of buffer solution were 4.0, 7.0, 9.0, the percutaneous speed were 12.623,4.916,3.121,separately, the statistic differences were obvious. The percutaneous speed of conium -moved skin was 9.60 times of normal skin. The concentration of MA in 6% aconiti solution was 0.00319%.**Conclusion:**Within pH 9.0 to pH 4.0, if the pH of buffer solution decreases, the percutaneous absorption of Aconitum alkaloids increases.The percutaneous absorption of Aconitum alkaloids with conium-moved skin obviously increases than normal skin.For the aconiti percutaneous absorptive therapy, the clinical 6% concentration is safe.

Author's address Dept. of Rehabilitation Medicine,Shandong University,Qilu Hospital,Jinan,250012

Key words mesaconitine;percutaneous absorption;pH;corneum

草乌是我国的传统中药,其主要成分为乌头类生物碱,如乌头碱 (aconitine)、新乌头碱(mesaconitine, MA)、次乌头碱(hypaconitine, HA)等。乌头生物碱为双酯类生物碱,具有明显的镇痛、抗炎、免疫抑制、麻醉、降压等作用,尤其在外用镇痛方面有其独到之处^[1],但毒性很大,乌头碱、新乌头碱、次乌头碱小鼠经口

LD50 分别为 1.8mg/kg、1.9mg/kg、5.8mg/kg^[2]。在物理治疗中常用直流电乌头碱离子导入治疗各种疾病引起

1 山东大学齐鲁医院康复科,济南市,250012

2 山东大学物理医学教研室

作者简介:岳寿伟,男,教授,博士生导师

收稿日期:2006-03-22

的疼痛^[3], 导入的成分以新乌头碱为主^[4]。新乌头碱的透皮吸收受很多因素的影响, 如促透因子、透皮溶液的 pH 值, 以及皮肤阻抗等。导入时乌头生物碱必须以离子形式进入体内, 所以生物碱的解离状态与导入的药量密切相关, 而乌头溶液的 pH 值对药物的解离程度影响很大。另外, 皮肤的角质层也是药物离子透过表皮的主要屏障。所以, 本研究定量观察了不同 pH 值以及去角质层皮肤下乌头透过速率, 同时测定了临床常用 6% 浓度乌头溶液中新乌头碱的含量, 以检测其透皮吸收的安全性。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 仪器: LC—6A 高效液相色谱仪 (日本岛津), CLC—ODS 柱 (Shim—Pack), Valia—Chien 扩散-吸收池 (中国科学院上海有机化学研究所制); 超级恒温水浴器 (上海); 多功能磁力搅拌器 (上海)。

1.1.2 药物与试剂: 新乌头碱标准品 (中国药品生物制品检定所提供); 草乌提取物: 草乌块根粉碎后经乙醇渗漉、酸水溶解、再经脱色、碱化、萃取后定容至生药 3g/ml 的浓度; 枸橼酸-磷酸氢二钠缓冲液 (pH4.0), 磷酸盐缓冲液 (pH7.0), 硼酸氯化钾缓冲液 (pH9.0) 均按 1990 年版中国药典二部 171—173 页项目下配制; 甲醇、乙腈为色谱纯, SDS、NaH₂PO₄、二氯甲烷及生理盐水均为分析纯。

1.1.3 动物分组: 选用体重 180—200g 的 Wistar 大鼠 28 只, 随机分为 4 个不同透皮条件组 (n=7): ① pH4.0 完整皮肤组, ② pH7.0 完整皮肤组, ③ pH9.0 完整皮肤组, ④ pH4.0 去角质层皮肤组。各组均采用直流电导入作为促透因子, 强度为 0.1mA/cm²。

1.2 实验方法

1.2.1 建立新乌头碱标准曲线: 色谱条件为: ODS 色谱柱; 流动相: 甲醇: 水: 乙腈 (67:33:2, 含 6mmol/L SDS 及 0.02mol/L NaH₂PO₄ 缓冲液, pH=4.5±2); 检测波长: 235nm; 流速: 1.0ml/min; 柱温: 35℃。精密称取对照品新乌头碱 3.031mg, 用二氯甲烷溶解。定量转移至 10ml 量瓶中, 加二氯甲烷至刻度, 摇匀, 作为对照品。分别取对照品溶液 1、2、3、4、5、6μl 进样, 测定新乌头碱的峰值面积, 重复进样 3 次, 记录平均峰面积 (A) 及对应新乌头碱量 (C, μg)。经统计学作回归计算, 绘制 A—C 标准曲线, 求得回归方程为: A 新乌头碱 = 481452.2C - 3966.24 (r=0.9990, 线性范围: 0.3031—1.8186μg)

精密度测定 RSD=2.84% (n=6)。

加样回收率测定 RSD=1.85%。

稳定性实验 RSD=1.4% (n=10)。

1.2.2 根据上述标准曲线, HPLC 分析测定 6% 乌头酞内新乌头碱浓度。 6% 乌头酞中新乌头碱含量为 0.00319%。

1.2.3 大鼠离体皮肤的制备: ① 室温下乙醚麻醉大鼠, 清洁背部去毛, 分离皮下组织及脂肪, 生理盐水、蒸馏水洗净, 滤纸吸干。② 去角质层皮肤的制备: 取得完整大鼠皮肤, 用永泰胶带完全黏于皮肤表面后揭下, 重复 30 次左右, 组织切片镜下观察, 得到去角质层大鼠皮肤。

1.2.4 离体鼠皮的透皮量: Valia—Chien 渗透池由两个半池组成, 每个半池体积 5ml, 池口有效扩散面积为 0.554cm²。剪取适当大小面积皮肤固定在释放池—接受池接合处, 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。释放池盛满草乌提取液 (生药 3g/ml), 接受液为生理盐水。直流电电极面积与皮肤大小等同, 阳极贴紧角质层置于释放池内, 阴极置于接受池底部, 电流强度为 0.1mA/cm²。开动超级恒温器水泵保持两池内温度为 37±0.5℃, 恒速搅拌。各不同透皮条件下, 均在实验开始后 10min、20min、30min、40min、50min 吸取接受池溶液 2ml, 离心后待测; 同时添加 2ml 接受液于接受池中保持原体积。取样液进行 HPLC 测定, 根据已得新乌头碱标准曲线, 计算各供药系统不同时间点对应接受液中新乌头碱浓度。

1.3 统计学分析

1.3.1 累积透过量 (accumulative permeation quantity, Q) 计算。

$$Q = 5Cn/A + 2 \sum_{i=1}^{i=n-1} C_i/A \quad \mu\text{g}$$

C_n 为第 n 个取样点测得的药物浓度; C_i 为第 i 个取样点测得的药物浓度; A 为池口有效扩散面积: A=0.554cm²

1.3.2 透皮速率 (percutaneous speed, J) 计算: 应用 SPSS11.5 统计分析系统, 以累积透过量 Q (μg/cm²) 对透皮吸收时间 t (min) 进行线性回归得 Q—t 方程, 其斜率即为透皮速率 J, 单位为 μg/(cm²·min)。

2 结果

相同直流电导入条件下不同 pH 缓冲液中, 新乌头碱的透皮速率分别为 J_{pH4.0}=12.623, J_{pH7.0}=4.916, J_{pH9.0}=3.121。Q—t 曲线见图 1。Q_{4.0}=12.623t+1.460 (r=0.980); Q_{7.0}=4.916t-0.500 (r=0.998); Q_{9.0}=3.121t-4.018 (r=0.994)。以上三条曲线比较: 当 α=0.05 时, 任何两组曲线均为 P<0.05。所以, 在缓冲液 pH 值分

别为 9.0、7.0、4.0 条件下, 透皮速率有显著性差异。

相同直流电导入条件下去角质层皮肤的透皮速率为 39.993, 为完整皮肤透皮速率的 9.60 倍。统计学回归的 $Q-t$ 曲线见图 2。 $Q_{\text{去角质}}=4.168t-14.253(r=0.992)$; $Q_{\text{完整皮肤}}=39.993t+3.146(r=0.998)$, 两组曲线比较 $P<0.05$ 。

表 1 不同条件下新乌头碱累积透过量 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)

组别	10min	20min	30min	40min	50min
pH4.0 完整皮肤组	160.59	359.84	499.29	616.78	863.26
pH7.0 完整皮肤组	46.21	98.36	150.93	196.36	243.02
pH9.0 完整皮肤组	26.80	60.40	90.16	115.40	155.36
pH4.0 去角质皮肤组	389.05	793.65	1243.97	604.97	983.03

图 1 不同 pH 下新乌头碱透皮吸收的 $Q-t$ 曲线 图 2 去角质层皮肤与完整皮肤的 $Q-t$ 曲线

3 讨论

直流电离子导入的主要作用对象是离子型药物, 药物的解离状态对其导入的量有很大影响。缓冲液的 pH 值影响药物的解离程度, 从而显著影响药物离子的导入量。新乌头碱是含氮的有机化合物, 其分子式为 $\text{C}_{24}\text{H}_{39}\text{NO}_6$ ^[5]。氮是四价元素, 能吸收质子组成共价键和酸结合生成盐 $\text{C}_{24}\text{H}_{39}\text{O}_6\text{N}\cdot\text{HCl}\cdot3^{1/2}\text{H}_2\text{O}$ 。该盐具有强吸水性, 可溶于水和酒精中, 在直流电场作用下电离, 生成带阳电的生物碱离子: $\text{C}_{24}\text{H}_{39}\text{O}_6\text{N}\cdot\text{HCl}\longrightarrow\text{C}_{24}\text{H}_{39}\text{O}_6\text{N}\cdot\text{H}^++\text{Cl}^-$ 。新乌头碱正离子 ($\text{C}_{24}\text{H}_{39}\text{O}_6\text{N}\cdot\text{H}^+$) 作为具有药物活性的离子, 在直流电场作用下从阳极进入人体发挥生物学效能。新乌头碱的解离度与缓冲液的 pH 值呈反比, 本实验证实, 在 pH4.0—9.0 范围, 新乌头碱的透皮速率随着缓冲液溶剂 pH 值的下降而增强。pH4.0 缓冲液条件下新乌头碱的透皮速率为 pH7.0 的 2.57 倍, 为 pH9.0 的 4.05 倍。另外, 高楚荣等^[6]研究亦证实, 在不同浓度溶媒炮制的 10% 乌头酊中, 其导电度均随 pH 的下降而升高。但过低的 pH 值会因其酸性对皮肤产生化学刺激乃至化学灼伤, 故在临床应用中, 我们可根据患者皮肤的耐受程度, 适当调整缓冲液 pH, 以保证药物离子的充分导入及患者安全耐受。

皮肤角质层由死亡的角化细胞组成, 厚约 10—15 μm 。它可以防止有害物质进入皮肤, 但同时也是药物透皮吸收的主要屏障^[7]。新乌头碱在透皮吸收

时, 由于带正电荷的新乌头碱离子难以透过富含类脂的角质层, 所以经表皮途径透皮速率很慢, 此时药物透皮吸收主要通过毛囊、汗腺及皮脂腺等皮肤附属器途径, 故导入的药物很少。皮肤去角质层后, 乌头碱离子透过表皮的屏障消失, 表皮途径成为主要途径, 透皮速率明显加快。本实验中, 去角质层皮肤的透皮速率远大于正常皮肤的透皮速率。前者为后者的 9.60 倍。这证实了角质层在药物透皮吸收中起着重要的屏障作用。故在临床治疗中, 可以通过可逆的改变皮肤角质层角蛋白的结构、松弛角蛋白之间的亲和力以至形成微细孔道, 来提高极性药物离子经细胞通道的导入量。这也是透皮促进剂的作用机制^[8]。同样当皮肤有破损时, 药物的导入明显增多, 此时应注意避免药物中毒的出现。

双酯型生物碱毒性很大, 如乌头碱口服 0.2mg 即可中毒, 3—5mg 可使人致死, 肌注 0.2—0.3mg 可引起死亡^[9]。实验表明, 直流电药物离子导入时, 若溶液浓度超过 5% 后, 药物的导入量与药物浓度并无显著关系, 导入人体体内的药物约占总药物的 5% 左右^[10]。故临床乌头导入治疗疼痛时, 一般选择生乌头溶液 6%, 导入时间 20min。本实验取 6% 浓度乌头酊为母液, 测得新乌头碱的浓度约为 0.00319%。乌头生物碱的三种主要毒性成分(乌头碱、新乌头碱、次乌头碱)中, 以新乌头碱含量最高^[2], 故根据上述推算, 导入的乌头碱总量远远低于其中毒量, 其安全性是可以肯定的。

参考文献

- [1] 刘志敏, 牛欣, 杨学智, 等. 草乌提取物乌头碱和新乌头碱的透皮速率测定[J]. 中西医结合学报, 2006, 4(1): 68—72.
- [2] 张宏顺. 乌头类中药的毒性及中毒处理[J]. 药物不良反应杂志, 2005, 7(2): 114—115.
- [3] 岳寿伟, 康乐, 王晓聆. 乌头直流电离子导入对佐剂性关节炎大鼠痛阈的影响[J]. 中国康复医学杂志, 2005, 20(6): 417—419.
- [4] 李路娥, 罗群, 王跃华, 等. 乌头碱检测方法综述[J]. 成都大学学报 (自然科学版), 2005, 24(1): 15—17.
- [5] 王勇, 刘宁, 宋凤瑞, 等. 乌头碱型 C19 去甲二萜生物碱的结构多样性[J]. 中草药, 2004, 35(3): 350—353.
- [6] 高楚荣, 郭其莲. 乌头酊直流电导入制剂的研究[J]. 中华理疗杂志, 1983, 6(2): 76.
- [7] Shah VP, Behl CR, Flynn GL, et al. Principles and criteria in the development and optimization to topical therapeutic products[J]. Pharm Res, 1992, 9(8): 1107—1111.
- [8] Osborne DW, Henke JJ. Skin penetration enhancing transdermal drug delivery[J]. Pharm Tech, 1997, 21(1): 50—66.
- [9] 黄光照, 胡炳蔚. 法医毒理学[M]. 第 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 1998. 131.
- [10] 郭万学. 理疗学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1984. 29—31.