

咪喹莫特乳膏的体外透皮吸收研究

於学良^{1*}, 张根元²(1.苏州卫生职业技术学院, 江苏 苏州 215009; 2.南京工业大学江苏省药物研究所有限公司, 南京 210009)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)01-0065-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.01.21

摘要 目的:建立测定咪喹莫特乳膏体外透皮吸收量的方法,并考察国产与进口制剂的体外透皮率。方法:采用体外扩散池法进行体外透皮试验,反相高效液相色谱法检测国产(3批)和进口(1批)咪喹莫特乳膏在37℃环境下透过离体小猪皮肤1、2、4、6、8、12、24 h的累积透皮率。色谱柱为Kromasil C₁₈,流动相为甲醇-0.05 mol/L磷酸二氢钾溶液-85%磷酸(48:52:0.2),流速为1.0 ml/min,检测波长为244 nm,进样量为50 μl。结果:咪喹莫特检测质量浓度的线性范围为0.01~2.0 μg/ml($r=0.999\ 2, n=6$),平均回收率为99.23%,RSD=0.51%($n=3$);国产和进口咪喹莫特乳膏的24 h体外累积透皮率均小于0.1%。结论:该方法操作简便、快速准确,可用于咪喹莫特乳膏的体外透皮研究。

关键词 咪喹莫特乳膏;反相高效液相色谱法;体外;透皮吸收

Study on Transdermal Absorption of Imiquimod Cream *in vitro*

YU Xue-liang¹, ZHANG Gen-yuan²(1.Suzhou Health College, Jiangsu Suzhou 215009, China; 2.Jiangsu Provincial Institute of Materia Medica, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the method for the determination of transdermal amount of Imiquimod cream *in vitro*, and to investigate transdermal rate of domestic and imported preparation *in vitro*. METHODS: The transdermal experiment was conducted by diffusion cell *in vitro*, and accumulative penetration rates of domestic (3 batches) and imported Imiquimod cream (1 batch) at 37 °C through isolated skin of piggy within 1, 2, 4, 6, 8, 12 and 24 h were determined by RP-HPLC. The determination was performed on Kromasil C₁₈ column with mobile phase consisted of methanol-0.05 mol/L potassium dihydrogen phosphate-85% phosphoric acid (48:52:0.2) at the flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was set at 244 nm, and sample size was 50 μl. RESULTS: The linear range of imiquimod was 0.01-2.0 μg/ml ($r=0.999\ 2, n=6$) with average recovery rate of 99.23% (RSD=0.51%, $n=3$). 24 h accumulative penetration rates of domestic and imported Imiquimod cream all were lower than 0.1%. CONCLUSIONS: The method is simple, rapid and accurate, and can be used for transdermal permeation study of Imiquimod cream.

KEYWORDS Imiquimod cream; RP-HPLC; *in vitro*; Transdermal absorption

咪喹莫特(Imiquimod)化学名称为1-异丁基-4-氨基-1*H*-咪唑并[4,5-*C*]咪唑,分子式为C₁₄H₁₆N₄,能够在用药局部诱导生成多种细胞因子及相关产物,产生免疫调节和间接抗病毒作用,临床上用于治疗成人外生殖器和肛门的疣/尖锐湿疣^[1]。咪

喹莫特在国内属于国家二类新药,主要剂型为乳膏剂。经查阅相关文献资料,未见报道咪喹莫特乳膏的透皮吸收研究。本文采用体外扩散池法,选用断奶1~10 d的小型猪背部皮肤模拟人体皮肤进行透皮吸收研究,以制剂中咪喹莫特透皮吸

.....

3 271.
[10] 高秀蓉,蒋学华,王婷. HPLC法测定蝙蝠葛碱与大鼠和人血浆蛋白的结合率[J]. 中国药房,2011,22(31):2 894.
[11] 苏琳,刘晨,李庆勇,等. 纳米喜树碱的蛋白结合率及其在血清中的稳定性研究[J]. 中国药房,2011,22(1):10.
[12] 黄勇,陈慧,何峰,等. 平衡透析法研究荜苈及其制剂的人血浆蛋白结合率[J]. 中国医院药学杂志,2012,32(21):

1 708.
[13] 陈莹,李月. 超滤法测定黄芩苷的血浆蛋白结合率[J]. 山西医药杂志,2010,39(7):677.
[14] 陈莹,蔡爽. 超滤法测定冬凌草甲素的血浆蛋白结合率[J]. 中国医药导报,2013,10(16):25.
[15] 薛云云,玛尔江·巴哈·提别克,王彦,等. 大鼠血浆中雷公藤红素的HPLC法测定[J]. 中国医药工业杂志,2011,42(7):532.

*副教授。研究方向:药物分析、药物化学。电话:0512-62690103。
E-mail: xlyu@szhct.edu.cn

(收稿日期:2014-02-06 修回日期:2014-04-19)
(编辑:张 静)

收量为指标,建立了以反相高效液相色谱(RP-HPLC)法检测咪喹莫特体外透皮吸收量的方法。结果表明,该方法能使样品得到较好的分离,排除辅料的干扰,且操作快速、简便、准确、重复性好,适用于产品的质量控制和体外透皮吸收量的检测。本文为外用制剂的体外透皮吸收提供了一个较好的研究方法,并为本品供皮肤局部使用提供了临床科学依据。

1 材料

1.1 仪器

Alltech 626型HPLC仪(美国Alltech公司);YB-P6智能透皮试验仪(天津药典标准仪器厂)。

1.2 药品与试剂

咪喹莫特对照品(中国食品药品检定研究院,批号:100632-200401,纯度:98%);咪喹莫特乳膏(批号:20090801、20090802、20090803,规格:150 mg:3 g)、空白乳膏均由江苏中丹制药有限公司提供;进口咪喹莫特乳膏(商品名:艾达乐,美国3M Health Care有限公司,批号:GKE069C,规格:12.5 mg:250 mg);甲醇、磷酸二氢钾、聚乙二醇400(PEG400,批号:090616)均由上海凌峰化学试剂有限公司提供,均为化学纯。

1.3 动物

小型乳猪,♀♂不拘,断奶1~10 d内,体质量5~6 kg,江苏省句容百福农业生态科技有限公司提供。

2 方法与结果

2.1 离体皮肤的制备

取小型乳猪,颈动脉放血处死,剥离背部皮肤,分离皮下组织及脂肪,用生理氯化钠溶液洗净,置于生理氯化钠溶液中,冷冻保存,1周内使用。

2.2 检测波长的确定

取咪喹莫特对照品适量,用“2.3”项下流动相溶解并稀释制成每1 ml中含3 μg的溶液,在200~400 nm波长范围内进行扫描。结果咪喹莫特在流动相溶液中于244 nm波长处有最大吸收,故选择244 nm作为检测咪喹莫特透皮吸收量的检测波长。

2.3 透皮吸收试验方法

采用Franz扩散池与YB-P6智能透皮试验仪。从冰箱中取出离体猪皮,在室温下化冻,固定于扩散池的给药室与接收室之间,内径1.8 cm,接收室容积约17 ml,磁转子转速300 r/min。扩散池一端用离体猪皮覆盖,使皮肤表层面向给药室,真皮一侧与接收液接触。精密称取咪喹莫特乳膏1.0 g,置给药室中涂抹均匀,并与皮肤密切接触。经预试验结果选定咪喹莫特透皮吸收的接收液为20% PEG400生理氯化钠溶液(取20 ml PEG400,加生理氯化钠溶液稀释至100 ml),水浴温度为37℃。在水浴温度达到预置温度时开始计时,分别于1、2、4、6、8、12、24 h取接收室中的接收液1 ml,同时立即向接收室中补充等体积同温度的接收液。

2.4 色谱条件

色谱柱:Kromasil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-0.05 mol/L磷酸二氢钾溶液-85%磷酸(48:52:0.2, V/V/V),流速:1.0 ml/min;柱温:室温;检测波长:244 nm;进样量:50 μl。

2.5 空白辅料的干扰试验

取离体猪皮,均匀地涂铺空白乳膏1.0 g,置透皮吸收试验装置中,以20% PEG400生理氯化钠溶液17 ml作为接收液,于24 h取样1 ml,精密量取空白乳膏接收液50 μl注入液相色谱仪,记录色谱;另取咪喹莫特对照品溶液及24 h的透皮吸收供试品溶液,分别进样,记录色谱。色谱图见图1。

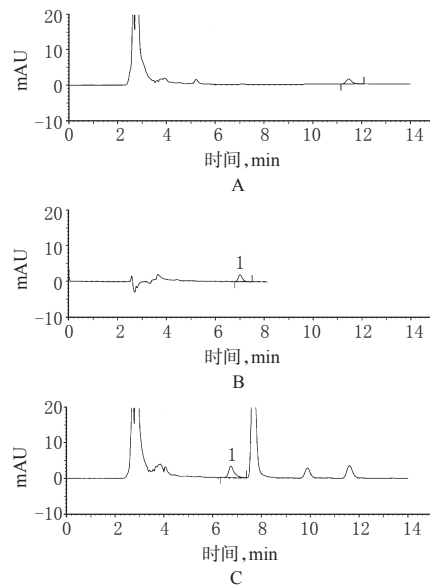


图1 反相高效液相色谱图

A.空白乳膏;B.对照品;C.供试品;1.咪喹莫特

Fig 1 RP-HPLC chromatograms

A. blank excipients; B. substance control; C. test sample; 1. imiquimod

由图1可见,咪喹莫特主峰的出峰时间约为6.5 min,空白乳膏在咪喹莫特主峰处无色谱峰出现,即空白乳膏对透皮接收液中咪喹莫特透皮吸收量的测定无干扰。供试品溶液中咪喹莫特主峰后有1个峰,二者分离度为2.62,符合《中国药典》相关要求,说明空白辅料对咪喹莫特的测定无干扰。

2.6 检测限与定量限考察

取咪喹莫特对照品适量,加适量甲醇溶解后,用20% PEG400生理氯化钠溶液配制成一定浓度的稀溶液,按信噪比为3和10分别测定检测限及定量限。结果咪喹莫特的检测限为0.05 ng,定量限为0.15 ng。

2.7 线性关系考察

取咪喹莫特对照品约10 mg,精密称定,置于100 ml量瓶中,加0.1 mol/L盐酸溶液溶解后,定容,摇匀。精密量取5 ml,置于50 ml量瓶中,加20% PEG400生理氯化钠溶液稀释至刻度,摇匀,再精密量取0.5、1.0、2.0 ml,分别置于10 ml量瓶中,加20% PEG400生理氯化钠溶液稀释至刻度,摇匀,制成0.5、1.0、2.0 μg/ml的溶液。精密量取0.5 μg/ml的溶液适量,用20% PEG400生理氯化钠溶液稀释并制成0.01、0.05、0.1 μg/ml的溶液,精密量取上述6种质量浓度的溶液各50 μl,分别注入液相色谱仪,记录色谱。以质量浓度(c)为横坐标、峰面积(A)为纵坐标进行线性回归分析,得回归方程为 $A = 3.052 \times 10^3 + 2.302 \times 10^5 c$ ($r = 0.999$, $n = 6$)。结果表明,咪喹莫特在20% PEG400生理氯化钠溶液中检测质量浓度的线性范围为0.01~

2.0 μg/ml。

2.8 进样精密性试验

取“2.7”项下质量浓度为0.5 μg/ml的咪喹莫特对照品溶液50 μl,重复进样5次,记录峰面积。结果峰面积的RSD为1.3% (n=5),表明仪器进样精密性良好。

2.9 溶液稳定性试验

取咪喹莫特对照品适量,加0.1 mol/L盐酸溶液溶解后,用空白乳膏24 h的皮肤接收液稀释并制成质量浓度为0.2 μg/ml的供试品溶液,室温放置0、2、4、6、8、12、24 h后,各精密量取50 μl,分别注入液相色谱仪,记录峰面积,考察咪喹莫特在透皮接收液中的稳定性。结果峰面积的RSD为0.45% (n=7),表明咪喹莫特在透皮接收液中24 h内稳定。

2.10 回收率试验

取咪喹莫特对照品约10 mg,精密称定,置于100 ml量瓶中,加0.1 mol/L盐酸溶液溶解后,精密量取5 ml,置于50 ml量瓶中,加空白乳膏24 h的皮肤接收液稀释至刻度,摇匀,制成咪喹莫特质量浓度分别为0.05、0.1、1 μg/ml的供试品溶液。各取50 μl上述供试品溶液分别注入液相色谱仪,记录峰面积,代入回归方程计算浓度和回收率。结果低、中、高质量浓度的回收率分别为98.67% (RSD=2.6%)、99.65% (RSD=0.63%)、99.36% (RSD=0.41%),平均回收率为99.23% (RSD=0.51%, n=3),表明咪喹莫特在透皮接收液中测定的准确度较好。

2.11 样品体外透皮率考察

精密量取“2.2”项下透皮接收液50 μl注入液相色谱仪,记录峰面积,代入回归方程计算各取样点的咪喹莫特浓度,并按下列公式计算单位面积累积透皮量(Q)和稳态渗透速率常数(J_s)。Q=(c_nV+∑c_iV_i)/A^[2],式中c_n为各取样时间点样品中咪喹莫特的质量浓度,V为接收室体积,c_i为各取样时间点前次取样液中咪喹莫特的质量浓度,V_i为取样体积,A为扩散池面积。以Q对渗透时间t进行线性回归分析,所得斜率即为J_s。根据以上Q值,即可计算出咪喹莫特乳膏的累积透皮率=Q/W×100%^[2],式中W为取样的样品中所含主药咪喹莫特的质量。3批样品与进口对照药的体外透皮结果见表1,累积透皮率-时间曲线见图2。

表1 咪喹莫特乳膏体外透皮结果

Tab 1 Transdermal permeation of Imiquimod cream

批号	回归方程	r	J _s , μg/(cm ² ·h)	Q _{24h} , μg/cm ²
20090801	Q=0.137 0t+0.083 0	0.982 9	0.137 0	3.58
20090802	Q=0.492 8t+2.509 0	0.988 0	0.492 8	13.72
20090803	Q=0.155 9t+1.375 2	0.974 0	0.155 9	4.87
GKE069C	Q=0.078 5t+1.149 6	0.977 0	0.078 5	3.17

由表1和图2结果可知,咪喹莫特乳膏3批样品与进口对照药的透皮吸收情况基本一致,24 h的累积透皮率平均值均小于0.1%,故可认为咪喹莫特乳膏作为外用皮肤药,仅为局部作用而非全身吸收作用。

3 讨论

据相关文献报道,透皮吸收常用的实验动物主要有小鼠、

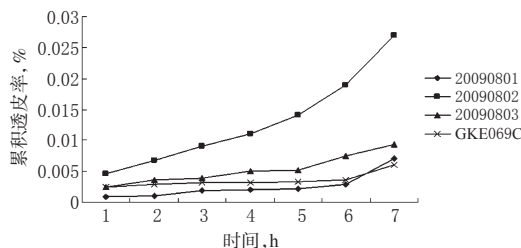


图2 咪喹莫特乳膏的累积透皮率-时间曲线

Fig 2 Accumulative penetration rate-time curve of Imiquimod cream

豚鼠、大鼠、猪、家兔及蛇^[3];刚断奶的乳猪与人体皮肤层次结构和渗透性最接近,是理想的皮肤模型^[4];特别是刚断奶的猪背皮肤与人的前臂皮肤最接近,且小型猪的皮肤与人的穿透性特征最接近^[5]。

皮肤外用药物进行透皮吸收试验,其接收液主要采用生理氯化钠溶液、30%乙醇-生理氯化钠溶液、聚乙二醇-生理氯化钠溶液(20:80)、pH 6.8及pH 7.4的磷酸盐缓冲液、10%聚山梨酯80的生理氯化钠溶液等^[6-7]。但笔者前期经溶解度试验发现,咪喹莫特几乎不溶于生理氯化钠溶液、30%乙醇-生理氯化钠溶液和pH 6.8的磷酸盐缓冲液。故笔者参照文献^[8-9],采用20% PEG400生理氯化钠溶液作为透皮接收液,发现可达到药物溶出介质所需的漏槽条件,结果可靠。

本试验建立了RP-HPLC法检测咪喹莫特乳膏体外透皮量的方法,该方法快速、灵敏、准确、可靠,为外用制剂的体外透皮吸收提供了一个较好的研究方法。

参考文献

- [1] 许岚.免疫调节剂咪喹莫特乳膏在皮肤科的临床应用进展[J].中国药房,2009,20(2):150.
- [2] 杨柳,王爱武,苗杰,等.6种透皮吸收促进剂对盐酸普萘洛尔乳膏透皮吸收性能的影响[J].中国药房,2013,24(29):2721.
- [3] 罗世英,陈华萍.透皮吸收常用的几种实验动物[J].中国药业,2004,13(4):74.
- [4] 毛宗珍,胡亚婷,郑英.噻酮对离体乳猪皮肤光透明效果影响的实验研究[J].光学学报,2007,27(3):526.
- [5] 柳朋生,郑家润.用猪作人透皮实验动物模型的有关资料[J].国外医学皮肤病学分册,2001,27(4):243.
- [6] 魏敏,周莉玲,黄春青,等.以主药溶解性能筛选体外经皮渗透试验中的接收液[J].中药材,2005,28(4):332.
- [7] 周莉玲,侯海霞,李锐.青蒿琥酯透皮吸收研究中接收液的筛选[J].中成药,2000,22(3):184.
- [8] 倪倩,丁虹,刘洁,等.咪喹莫特固体脂质纳米粒的制备及体外透皮作用[J].中国医药工业杂志,2006,37(8):537.
- [9] 刘红,吴迪,谷亦平,等.咪喹莫特微乳的制备及体外透皮评价[J].中国医药工业杂志,2007,38(7):496.

(收稿日期:2014-07-14 修回日期:2014-10-17)

(编辑:邹丽娟)