

不同基质氢化可的松软膏经糖尿病模型大鼠皮肤的透过性研究

张健明^{1*}, 李沙沙², 谢灼骥¹, 关东玲¹, 李国锋^{3#}(1.开平市第二人民医院, 广东 开平 529367; 2.暨南大学附属第一医院药学部, 广州 510630; 3.南方医科大学南方医院药学部, 广州 510515)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)19-2667-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.19.23

摘要 目的:研究不同基质的氢化可的松软膏经糖尿病模型大鼠皮肤的透过性。方法:分别制备氢化可的松O/W型软膏、水溶性基质软膏和油脂性基质软膏。取Wistar大鼠随机分为正常对照组和模型组,模型组大鼠ip给予链脲菌素(40 mg/kg)以复制糖尿病模型。采用Franz扩散池透皮试验和高效液相色谱法,考察氢化可的松O/W型软膏、水溶性基质软膏和油脂性基质软膏分别经两组大鼠皮肤的透过速率。结果:与正常对照组比较,氢化可的松O/W型软膏和水溶性基质软膏经模型组大鼠皮肤的透过速率明显增加,差异具有统计学意义($P < 0.05$);氢化可的松油脂性基质软膏经模型大鼠皮肤的透过速率差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论:氢化可的松O/W型软膏、水溶性基质软膏较易透过糖尿病模型大鼠皮肤;氢化可的松油脂性基质软膏不易透过糖尿病模型大鼠皮肤。

关键词 基质;氢化可的松;糖尿病;大鼠;透过速率;Franz扩散池

Study on the Percutaneous Permeability of Hydrocortisone Cream with Different Substrates in Diabetic Model Rats

ZHANG Jian-ming¹, LI Sha-sha², XIE Zhuo-ji¹, GUAN Dong-ling¹, LI Guo-feng³(1.The Second People's Hospital of Kaiping, Guangdong Kaiping 529367, China; 2.Dept. of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Jinan University, Guangzhou 510630, China; 3.Dept. of Pharmacy, Nanfang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the percutaneous permeability of Hydrocortisone cream with different substrates in diabetic model rats. METHODS: The Hydrocortisone O/W (oil/water) cream, water-soluble cream and oil-soluble cream were respectively prepared. Wistar rats were randomly divided into normal control group and model group. Model group was given streptozotocin (40 mg/kg) to reproduce diabetic model. Franz diffusion cell percutaneous test and HPLC were used to detect the percutaneous permeability rates of Hydrocortisone O/W cream, water-soluble cream and oil-soluble cream in rats of 2 groups. RESULTS: Compared with normal control group, the percutaneous permeability rates of Hydrocortisone O/W cream and water-soluble cream were obviously increased, with significant difference ($P < 0.05$); there was no significant difference in the percutaneous permeability rate of oil-soluble cream ($P > 0.05$). CONCLUSIONS: Hydrocortisone O/W cream and water-soluble cream are easier to go through the skin of diabetic model rats, and Hydrocortisone oil-soluble cream is hard.

KEYWORDS Substrates; Hydrocortisone; Diabetes; Rat; Permeation rate; Franz diffusion cell

糖尿病对人类健康的威胁正日益显现,其并发症发生率高、发生早、发展快、后果严重,是引起糖尿病患者致死、致残的主要原因。资料显示,糖尿病患者中患皮肤病的比例约为25%~30%^[1-2],因此糖尿病患者的皮肤与健康人群相比,可能存在差异性。对于糖尿病患者而言,体内皮质激素的增加,会抑制胰岛素在血液中的分泌,引起血糖升高,将加重各种并发症的严重程度,极大地缩短患者的预期寿命^[3]。然而,糖尿病患者应用皮质激素的比例仍然很高,特别是皮质激素的外用问题。但局部应用皮质激素后,在正常人群和糖尿病人群中的经皮渗透差异及经皮吸收机制尚无进一步的研究。笔者选用了目前皮肤外用制剂常用的药物氢化可的松,并选择了其

常用外用剂型乳膏剂作为模型药物,采用Franz体外扩散池技术比较分析不同基质氢化可的松软膏经糖尿病模型大鼠皮肤的透过性,并与正常大鼠皮肤进行比较,为糖尿病患者在外用皮质激素时,科学地使用及选择药物提供实验依据,从而进一步指导临床合理用药。

1 材料

1.1 仪器

1100系列高效液相色谱仪(美国Agilent公司);TK-20A型药物透皮扩散试验仪(上海铂凯科技贸易有限公司);Thermo Scientific Sorvall Legend Mach 1.6/R型台式离心机(美国Thermo公司);OneTouch Ultra 2型血糖仪及试纸(美国Johnson公司);S40 SevenMulti酸度计(瑞士Mettler Toledo公司);BX51M型金相显微镜(日本Olympus公司)。

1.2 药品与试剂

氢化可的松对照品(批号:H0135,纯度:99.8%)、链脲佐菌素(STZ,批号:S0130,规格:1 g/100 mg)均购自美国Sigma

* 主管药师。研究方向:经皮给药。电话:0750-2626391。E-mail:kp2626391@163.com

通信作者:教授,博士生导师,博士。研究方向:新剂型及其体内转运评价。电话:020-62787236。E-mail:lgfnfnf@fimmu.edu.cn

公司;氢化可的松原料药(深圳市益飞商贸有限公司,批号:20131206,纯度:99.3%);柠檬酸、柠檬酸三钠以及乳膏基质辅料(硬脂酸、单硬脂酸甘油酯、液体石蜡、白凡士林、十二烷基硫酸钠、甘油、三乙醇胺)等试剂均为分析纯;甲醇为色谱纯,水为双蒸去离子水。

1.3 动物

SPF级Wistar大鼠,♂,体质量(250±10)g,由南方医科大学实验动物中心提供,实验动物使用许可证号:SCXK(粤)2006-0015。动物饲养于广州中医药大学实验动物中心SPF级动物房,室内温度保持为(23±2)℃,相对湿度保持为50%~70%,光照节律为光照12h、黑夜12h,饲养环境安静、通风。实验动物给予普通饲料和清洁饮水。正式实验开始前所有动物适应性饲养7d。普通饲料由广州中医药大学实验动物中心提供。

2 方法与结果

2.1 复制模型

糖尿病大鼠模型的复制参照前期研究^[4]。大鼠禁食12h,于次日清晨空腹状态下测血糖(BGC),剔除血糖过高(>6mmol/L)^[5]或偏离正常值较大的大鼠,将剩余的45只大鼠随机分为正常对照组(20只)和模型组(25只)。将模型组大鼠称体质量后一次性ip给予0.1mol/L(pH4.4)柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液稀释的1%STZ以复制模型,注射剂量为40mg/kg^[6]。复制模型后第28天分别对大鼠称体质量并测量血糖,用血糖仪测尾尖血糖,以血糖值>16.7mmol/L作为糖尿病成型标准^[7]。正常对照组大鼠单次ip给予等容量的0.1mol/L(pH4.4)柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液。

2.2 体质量的变化

复制模型前,大鼠的平均体质量为(251±3.2)g(n=45)。复制模型28d后,正常对照组大鼠体质量为(291±4.6)g(n=20),模型组大鼠体质量为(216±8.2)g(n=22,有3只大鼠死亡,故未进行统计)。两组大鼠体质量变化有明显差异。

2.3 血糖的变化

复制模型前,大鼠的平均血糖值为(4.3±0.3)mmol/L(n=45)。复制模型28d后,正常对照组大鼠血糖值为(4.5±0.5)mmol/L(n=20),模型组大鼠血糖值为(24.6±2.3)mmol/L(n=20,有2只大鼠血糖值<16.7mmol/L,故未进行统计),表明大鼠复制模型成功。

2.4 氢化可的松O/W型软膏、水溶性基质软膏和油脂性基质软膏的制备

将氢化可的松分别用3种不同的基质制成1%的氢化可的松软膏^[4]。O/W型乳膏的处方为:氢化可的松1g,硬脂酸10g,单硬脂酸甘油酯5g,液体石蜡14ml,白凡士林5g,甘油5g,十二烷基硫酸钠0.1g,三乙醇胺0.35g,蒸馏水61.6ml,制成100g。水溶性基质软膏的处方为:氢化可的松1g,聚乙二醇4000 49.5g,聚乙二醇400 49.5g。油脂性基质软膏的处方为:氢化可的松1g,羊毛脂49.5g,白凡士林49.5g。

2.5 分组与给药

取正常对照组和模型组大鼠各18只,各分为3组,每组6只。分别考察氢化可的松O/W型软膏、水溶性基质软膏和油脂性基质软膏经皮透过速率。

2.6 氢化可的松含量测定方法的建立

2.6.1 色谱条件 色谱柱:Kromasil C₁₈(150mm×4.6mm,5

μm);流动相:甲醇-水(60:40),流速:1.0ml/min;检测波长:242nm;柱温:30℃;进样量:20μl。

2.6.2 对照品溶液的制备 精密称取氢化可的松对照品20mg,置于100ml量瓶中,加甲醇溶解并定容至刻度,制成每1ml含200μg的溶液,即得。

2.6.3 供试品溶液的制备 精密称取1%氢化可的松O/W型软膏1g、1%氢化可的松水溶性基质软膏1g、1%氢化可的松油脂性基质软膏1g,分别置于烧杯中,加甲醇约30ml,在水浴上加热使溶解,再置冰水中冷却,滤过,滤液置于100ml量瓶中。共提取3次,将3次滤液合并至量瓶中,甲醇稀释至刻度,摇匀,离心,取上清液,即得3种不同基质的供试品溶液^[8]。

2.6.4 阴性样品溶液的制备 制备不含氢化可的松的O/W型空白软膏、水溶性基质空白软膏、油脂性基质空白软膏,按“2.6.3”项下方法制备成阴性样品溶液。

2.6.5 专属性考察 精密吸取对照品溶液、供试品溶液和阴性样品溶液进样测定,记录色谱。结果显示,阴性样品溶液中在与对照品相对应的位置上没有色谱峰,表明阴性样品无干扰,色谱图见图1。

2.6.6 线性关系考察 将氢化可的松对照品溶液用甲醇逐级稀释,制备成质量浓度分别为200、100、50、25、12.5、6.25、3.12、1.56、0.78、0.39、0.20、0.10μg/ml的对照品溶液,进样测定,记录峰面积。以峰面积(y)为纵坐标、质量浓度(c)为横坐标,进行回归分析,得回归方程为 $y=57.790c+48.230$ ($r=0.9999$)。结果表明,氢化可的松检测质量浓度的线性范围为0.10~200μg/ml。

2.6.7 回收率试验 分别以pH7.4的磷酸盐缓冲液(PBS)为溶剂制备质量浓度分别为200、25、0.78μg/ml的对照品溶液,进样测定,记录峰面积,代入回归方程计算质量浓度,以其与实际浓度比较,计算回收率,结果见表1。

2.6.8 精密度试验 精密称取氢化可的松对照品,制备成质量浓度分别为200、25、0.78μg/ml的对照品溶液,每日测定5次,重复测定5d,考察日内及日间精密度,结果见表2。

2.6.9 含量测定 按照“2.6.1”项下色谱条件进样测定氢化可的松O/W型软膏、水溶性基质软膏和油脂性基质软膏中氢化可的松的含量。结果表明,3种基质软膏中氢化可的松的含量依次为(98.5±2.1)%、(103.2±1.9)%、(96.2±2.3)%,RSD依次为2.13%、1.84%、2.39%(n=3)。

2.7 体外透皮试验

取正常对照组和模型组大鼠进行透皮试验。将大鼠用戊巴比妥钠ip麻醉(40mg/kg),用电动剃须刀除去腹部鼠毛,取下已去毛的鼠皮,放血处死大鼠。用沾有生理盐水的脱脂棉小心地除去皮下脂肪待用。取已准备好的大鼠腹部皮肤固定在已预热好的扩散池中(每只大鼠皮做3份样品)。透皮扩散有效内径为1.8cm,接收室体积为6.5ml,接收液为PBS(pH7.4)溶液。整个试验过程恒温(37±0.2)℃,300r/min搅拌。分别取氢化可的松O/W型软膏、水溶性基质软膏和油脂性基质软膏各1.5g加于供给室中,供给室上用保鲜膜封口,防止水分蒸发。分别于0.5、1、2、3、5、8、12h从接收液中取样0.4ml,同时补充相同体积、相同温度的新鲜接收液。样品液以离心半径为5.5cm、15000r/min离心10min,取上清液按“2.6.1”项下色谱条件进样,测定计算氢化可的松质量浓度。将测得的样品质量浓度按下列公式计算单位面积的累积透过量(Q)^[9],

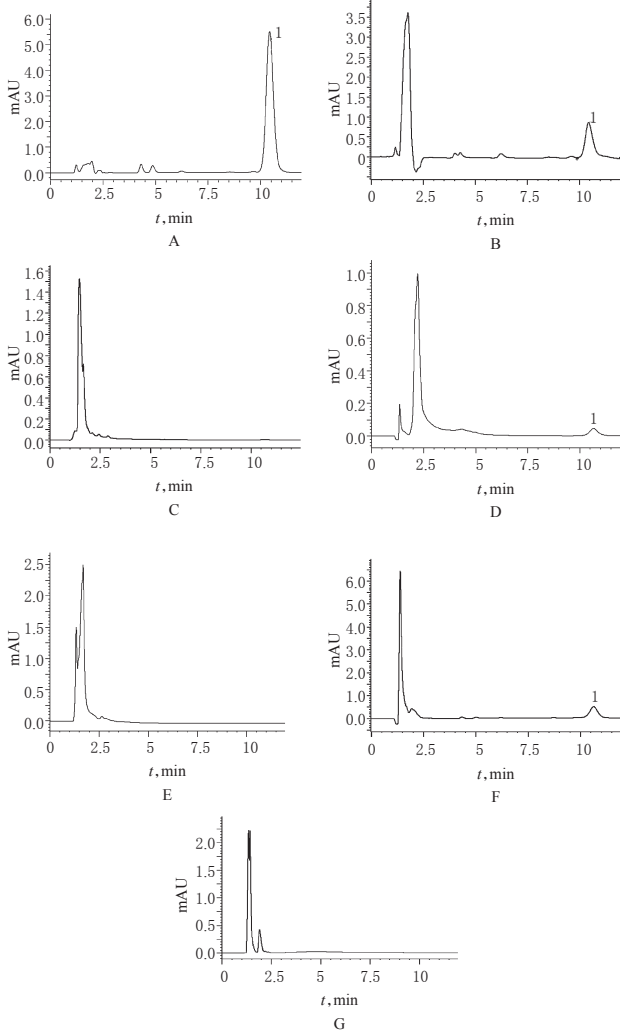


图1 高效液相色谱图

A. 氢化可的松对照品; B. 氢化可的松O/W型软膏; C. O/W型空白软膏; D. 氢化可的松水溶性基质软膏; E. 水溶性基质空白软膏; F. 氢化可的松油性基质软膏; G. 油性基质空白软膏; 1. 氢化可的松

Fig 1 HPLC chromatograms

A. hydrocortisone reference; B. Hydrocortisone O/W cream; C. O/W blank cream; D. Hydrocortisone water-soluble cream; E. water-soluble blank cream; F. Hydrocortisone oil-soluble cream; G. oil-soluble blank cream; 1. hydrocortisone

表1 回收率试验结果(n=3)

Tab 1 Results of recoveries tests (n=3)

理论质量浓度, $\mu\text{g/ml}$	测得质量浓度, $\mu\text{g/ml}$	回收率, %	RSD, %
200	194.5	97.3	0.806
26	24.9	95.8	
0.78	0.75	96.2	

表2 精密度的试验结果(n=3)

Tab 2 Results of precision test (n=3)

氢化可的松质量浓度, $\mu\text{g/ml}$	日内RSD, %	日间RSD, %
200	0.78	2.32
25	0.49	1.87
0.78	0.65	1.57

$Q = [c_n \times V + \sum c_i \times 0.4] / A_0$ 。式中V为接收池的体积, c_n 为第n个取样点测得的药物质量浓度, A为有效扩散面积(本试验中为

2.5434 cm^2), c_i 为第*i*($i \leq n-1$)个取样点测得的药物浓度。

以Q对时间(t)作图, 拟合得到氢化可的松从不同剂型中释放的透过曲线图, 并对其进行线性回归分析, 回归方程的斜率为药物透过速率。计量资料结果用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 并采用SPSS 13.0软件进行统计分析, 组间比较采用单向方差分析(One-way ANOVA)。3种基质氢化可的松软膏经大鼠皮肤的透过速率测定结果见表3。

表3 3种基质氢化可的松软膏经大鼠皮肤的透过速率测定结果[$\bar{x} \pm s, n=6, \text{g}/(\text{h} \cdot \text{cm}^2)$]

Tab 3 Comparison of percutaneous permeability rates of Hydrocortisone cream with different substrates [$\bar{x} \pm s, n=6, \text{g}/(\text{h} \cdot \text{cm}^2)$]

制剂类型	正常对照组	模型组
氢化可的松O/W型软膏	2.41 ± 0.87	$5.12 \pm 1.03^*$
氢化可的松水溶性基质软膏	1.96 ± 0.76	$7.24 \pm 1.42^{**}$
氢化可的松油性基质软膏	1.03 ± 0.52	1.32 ± 0.49

注: 与正常对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Note: vs. normal control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

由表3结果可知, 对正常大鼠皮肤来说, 采用O/W型软膏给药使氢化可的松具有较高的透过速率。3种氢化可的松外用软膏剂经糖尿病大鼠皮肤透过时, 采用O/W型软膏或水溶性基质给药时, 透过速率同正常大鼠比较差异具有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$); 但采用油性基质软膏给药时, 糖尿病模型大鼠与正常大鼠比较透过速率差异无统计学意义。由此推测, 对于糖尿病患者来说, 应用O/W型软膏和水溶性基质软膏时需要减少给药剂量, 而应用油性基质软膏时可以参照正常给药剂量。

3 讨论

透皮试验是评价药物制剂经皮吸收特性的一种重要手段, 其方式主要分为离体试验和在体试验。扩散池试验是评价离体皮肤透过性最常用的方法, 而且扩散池使用方便、经济、省时、可以重复使用, 也是评价药物经皮吸收的第一步^[9]。笔者采用了Franz扩散池法比较评价了不同基质的氢化可的松乳膏经正常大鼠及糖尿病大鼠皮肤的透过差异, 样品检测采用了高效液相色谱法, 并且建立了成熟稳定的氢化可的松检测方法。

前期的病理生理学检查发现, 糖尿病大鼠的皮肤组织变薄, 表皮细胞层次欠清晰, 并且部分表皮缺乏复层结构, 这可能是由于糖尿病大鼠皮肤的糖基化终端产物导致表皮的成纤维细胞过氧化损坏而形成的。由于糖尿病大鼠皮肤组织发生了变化, 对药物的透皮吸收也会产生一定的影响^[10]。

在前期的研究中, 只采用了一种氢化可的松的软膏制剂(O/W型)来评价糖尿病大鼠皮肤改变及其对氢化可的松经皮吸收的影响。结果发现, 同正常大鼠的经皮透过速率(2.41 ± 0.87) $\mu\text{g}/(\text{h} \cdot \text{cm}^2)$ 比较, 复制模型4周后的糖尿病大鼠, 氢化可的松的透过速率增加到(5.12 ± 1.03) $\mu\text{g}/(\text{h} \cdot \text{cm}^2)$, 是正常对照组的2.1倍, 提示糖尿病患者在外用氢化可的松制剂时可能需要调整给药剂量^[5]。笔者进一步将氢化可的松制成水溶性基质软膏和油性基质软膏, 比较氢化可的松经糖尿病和正常大鼠皮肤的渗透吸收差异, 来进一步分析外用基质的差异对氢化可的松经糖尿病大鼠皮肤的透过特性差异, 从而为糖尿病患者在外用皮质激素时, 科学地使用及选择药物提供实验依据。这对进一步指导临床合理用药, 具有充分的研究价值

芳基吡嗪酮酸姜黄素酯的合成

刘磊*, 孙凯, 陈颂, 王鑫, 王静(齐齐哈尔医学院药学院, 黑龙江齐齐哈尔 161006)

中图分类号 R979.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)19-2670-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.19.24

摘要 目的:合成芳基吡嗪酮酸姜黄素酯。方法:以5-甲基-2-(3-氯-4-氟苯基)-2-氧代吡嗪酮(化合物1)和姜黄素为原料,在*N,N*-二环己基碳二酰亚胺(DCC)/4-二甲氨基吡啶(DMAP)催化下,姜黄素两侧酚羟基与吡嗪酮6位羧基双侧成酯。经柱层析分离,得到目标产物,质谱和核磁表征其结构,并单因素考察原料配比、反应温度、反应时间、催化剂对反应的影响。结果:经表征,目标产物即芳基吡嗪酮酸姜黄素酯,产率为56.3%(以姜黄素计),高效液相色谱法测得含量为98.1%。最优反应条件为姜黄素-化合物1的配比为1:3,反应温度为50℃,反应时间为10h,催化剂为DCC/DMAP。结论:成功合成芳基吡嗪酮酸姜黄素酯,且工艺稳定。
关键词 姜黄素;芳基吡嗪酮酸;酯化;合成

Synthesis of Aryl-pyridazinone Acid and Curcumin Ester

LIU Lei, SUN Kai, CHEN Song, WANG Xin, WANG Jing (School of Pharmacy, Qiqihar Medical University, Heilongjiang Qiqihar 161000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To synthesize the aryl-pyridazinone acid and curcumin ester. METHODS: With the raw material of 5-methyl-2-(3-chloro-4-fluorophenyl)-2-oxo-pyridazine acid (compound 1) and curcumin, there was ester-forming in the two sides of a phenolic hydroxyl and pyridazin-6-one carboxyl in curcumin by the catalysis of *N,N*-dicyclohexyl carbodiimide (DCC) / 4-dimethylaminopyridine (DMAP). The targeted product, MS and NMR characterization of the structure were obtained through column chromatographic separation. Single factor was adopted to detect the effect of mixture ratio of curcumin and compound 1, reaction temperature and time and catalyst on the reactions. RESULTS: The productivity of targeted product (aryl-pyridazinone acid and curcumin ester) was 56.3% (in curcumin), the content by HPLC was 98.1%. The optimum conditions were as follows as the mixture ratio of curcumin and compound 1 was 1:3, reaction temperature was 50℃, reaction time was 10 h and the catalyst was DCC/DMAP. CONCLUSIONS: The aryl-pyridazinone acid and curcumin ester is successfully synthesized with stable process.

KEYWORDS Curcumin; Aryl-pyridazinone acid; Esterification; Synthesis

和实际应用价值。并期望通过在合理用药的指导下,提高糖尿病患者生命质量,降低患者的治疗费用。

长期以来,在药物的合理使用中,人们较多关注肝功能不全时对药物体内转运的影响,而本文从危害人类健康越来越大的糖尿病出发,使用生物药剂学的基本原理和方法,有针对性地研究糖尿病是否改变氢化可的松皮质激素的经皮渗透和吸收的机制,这是对药剂学和临床药理学学科发展的完善与有益探索。

参考文献

- [1] Seirafi H, Farsinejad K, Firooz A, et al. Biophysical characteristics of skin in diabetes: a controlled study[J]. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 2009, 23(2): 1469.
- [2] Behm B, Schreml S, Landthaler M, et al. Skin signs in diabetes mellitus[J]. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 2012, 26(10): 1203.
- [3] Li SS, Song ZH, Xiong LQ, et al. The percutaneous permeability and absorption of dexamethasone esters in diabetic rats: a preliminary study[J]. *Drug Deliv*, 2014, 21(1): 17.
- [4] 王琳, 李国锋, 胡文军, 等. 糖尿病大鼠皮肤的组织学改变

及其对糖皮质激素药物经皮吸收的影响[J]. *药学报*, 2010, 45(1): 114.

- [5] 时进, 张颖冬, 林兴建, 等. 高血糖及胰岛素干预对大鼠脑缺血再灌注损伤的影响[J]. *临床神经病学杂志*, 2007, 20(4): 284.
- [6] Tunali S, Yanardag R. Protective effect of vanadyl sulfate on skin injury in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. *Hum Exp Toxicol*, 2013, 32(11): 1206.
- [7] 陆英杰, 连至诚, 钟毅, 等. 30周糖尿病大鼠胃排空与幽门螺杆菌的检测[J]. *中国实验动物学报*, 2007, 15(4): 313.
- [8] 方焱, 张善堂, 陈象青, 等. 氯霉素氢化可的松乳膏的制备及质量控制[J]. *中国药房*, 2007, 18(16): 1245.
- [9] Li SS, Li GF, Liu L, et al. Evaluation of paeonol skin-target delivery from its microsp sponge formulation: in vitro skin permeation and in vivo microdialysis [J]. *PLoS One*, 2013, 8(11): e79881.
- [10] Niu Y, Cao X, Song F, et al. Reduced dermis thickness and AGE accumulation in diabetic abdominal skin[J]. *Int J Low Extrem Wounds*, 2012, 11(3): 224.

* 助教, 硕士研究生。研究方向:天然药物有效成分结构修饰。
E-mail: 598031128@qq.com

(收稿日期:2014-09-12 修回日期:2015-03-13)

(编辑:邹丽娟)