

Azone预处理对抗病毒药 Ara-ADA 穿透 无毛小鼠皮肤的持续影响

徐 惠 南

(上海医科大学药学院药剂学教研室, 上海200032)

摘要 本文用两个半池组成的扩散池测定了4~6周无毛小鼠腹部皮肤用1-十二烷基氮杂环庚烷-2-酮(Azone)预处理24h后, 对抗病毒药2',3'-双乙酰阿糖腺苷(2',3'-di-O-acetyl- β -D-arabinofuranosyl adenine 简称 Ara-ADA) 透过皮肤促进作用的持续效应。皮肤经 Azone 处理后, 立即或分别测定经历4, 5, 6, 7, 8 d 后的穿透系数。结果表明, 经 Azone 处理后的无毛小鼠皮肤可使 Ara-ADA 的穿透系数提高44倍, 皮肤经 Azone 处理一次后, 药物透过皮肤的促进作用至少可持续8 d, 药物通过皮肤的扩散时滞明显缩短。

关键词 透皮促进剂; 1-十二烷基氮杂环庚烷-2-酮; 2',3'-双乙酰阿糖腺苷

多数药物特别是亲水性药物不能通过完整皮肤进入体内达有效治疗浓度, 为此在开发透皮给药体系的同时, 必须研究改善药物透皮吸收的方法。近年1-十二烷基氮杂环庚烷-2-酮(1-dodecylazacyclo heptan-2-one, 简称 Azone) 的推出^(1~3), 为透皮给药带来新的生机。

不少研究报道^(4~7)指出, 用 Azone 预先处理皮肤, 药物可有更强的穿透作用, 而且经皮扩散时滞消失或大大缩短, 透皮作用可立即发生。Komada 等⁽⁸⁾用 Azone 预处理无毛小鼠腹部皮肤24 h, 可使抗病毒药 Ara-A 及其前体药物的穿透系数提高100~1000倍, 即可使穿透系数高达 1×10^{-5} cm/s, 若以穿透系数低于此值的控速膜制成透皮给药体系, 则可控制药物恒定地通过皮肤进入体内达治疗浓度。Azone 预处理皮肤后, 对药物穿透皮肤的促进作用可持续多久? 迄今无系统研究, 尽管 Wotton⁽⁹⁾进行了一些工作, 但仅限于体外研究。本文拟研究 azone 预处理活体无毛小鼠腹部皮肤后对 Ara-ADA 穿透的持续影响, 这对药物是否能长时间持续高效穿透皮肤产生治疗作用是至关重要的。

实 验 部 分

一. 材料与试剂

³H 标记的 Ara-ADA (2', 3'-di-O-acetyl- β -D-arabino-furanosyl adenin; New England Nuclear, Boston, MA) 用薄层层析法纯化后应用。Azone, 药用规格, 由 Nelson Research 公司 (Irvine, Calif, USA) 赠送。pH 5 醋酸-醋酸钠缓冲液, Ara-ADA 在此溶液中稳定性佳。对硝基醋酸苯 (简称 PNA), 作酯酶抑制剂, 在 pH 5 醋酸-醋酸钠缓冲液中加入 0.01% PNA, 可防止皮肤内酯酶对 Ara-ADA 的分解作用。Opti-Fluor 闪烁液

动物 4~6 周 SKH-HR-1 型无毛小鼠 (Temple University, Philadelphia, PA, USA), 体重 12~17 g。

二. 方法与结果

(一) 方法

1. 动物皮肤的预处理及皮肤膜的制备

将夹层内衬有棉花的纱布裁成 1.5×1.5 cm 的小方块, 在每块纱布上均匀滴加 $46.2 \mu\text{l}$ Azone(相当于 50 mg)。无毛小鼠用乙醚轻度麻醉后, 将含 Azone 的纱布复盖于腹部皮肤上, 并用略大于纱布的外科用胶布使其固定并以合适方法防止纱布脱落或被鼠撕去。24 h 后, 除去含 Azone 的纱布, 或立即取皮测定渗透系数或用合适大小的控速膜复盖于 Azone 处理过的皮肤上, 并用合适方法固定, 分别经 4, 5, 6, 7, 8 d, 取皮测定渗透系数。

分别将经 Azone 处理 24 h 或处理后经过 4, 5……8 d 的小鼠处死, 立即用钝头解剖剪刀将小鼠腹部全皮小心分离, 除去皮下脂肪, 剪取略大于扩散池扩散面的经 Azone 处理的皮肤, 供试验用。

2. 扩散池

由两个玻璃制成的半池组成。每个半池的体积为 $1.8 \sim 2.2$ ml, 有效扩散面积为 $0.69 \sim 0.73$ cm²。每个半池内装有聚四氟乙稀制成的搅拌器, 由 150 r/min 的恒速电动机带动旋转。图 1 为扩散池示意图。

3. 透皮扩散试验过程

将剥离的无毛小鼠皮肤固定在两个半池的中间, 角质层面向供给室 (即含药半池), 真皮向着接受室 (即采样半池)。用弹簧夹将两半池夹紧并在两半池结合处用聚四氟乙烯薄膜缠裹。分别在两半池内加入含 0.01% PNA 的 pH 5 醋酸-醋酸钠缓冲液 $1.8 \sim 2.2$ ml, 分别记录准确的加入量。将如上装好的扩散池置于 37°C 恒温水浴内, 开动搅拌器经 15 min 平衡后, 分别自供给室和接受室中取 $100 \mu\text{l}$ 样品, 放入预先盛有 10 ml 闪烁液的计数瓶内作空白样品。然后补充 $100 \mu\text{l}$ 缓冲液至接受池内, 供给池内加入含 ³H 标记约 1.85×10^6 Bq Ara-ADA 的 pH 5 缓冲液 $100 \mu\text{l}$ 并记录时间。在设定时间自供给室和接受室分别取样 3 和 $100 \mu\text{l}$, 样品同样放入含闪烁液的计数瓶内。接受室于每次取样后应补充 $100 \mu\text{l}$ pH 5 缓冲液。计数瓶内的样品用旋涡混合器混匀后置 Beckman LS-7500 型液闪计数器内测定放射性强度。因接受室内连续取样并每次补加新缓冲液, 测得数值较真值小, 可按下式进行校正:

$$C_n^* = C_n + \frac{0.1}{V} \sum_{i=1}^{i=n-1} C_{n-1}$$

式中 C_n^* 为第 n 次样品的校正浓度 (dpm/ml); C_n 为第 n 次样品的实测浓度; V 为接受室内溶液的体积。

4. 数据处理方法

根据 Fick 扩散第一定律:

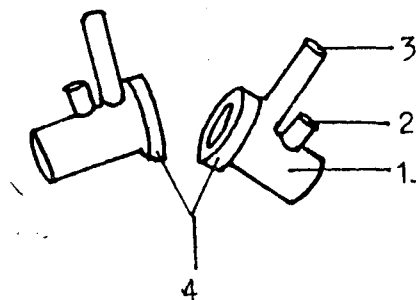


Fig 1. Sketch of diffusion cell. 1. Half-cell; 2. Sampling port; 3. Stirring port; 4. Clamping flange.

$$\frac{dM}{dt} = PA(C_d - C_r) \tag{1}$$

式中M为供给室中药物通过皮肤进入接受室的质量，t为扩散时间，P为渗透系数，C_d是供给室的药物浓度，C_r是接受室内的药物浓度，A为有效扩散面积。本实验中C_d约为C_r的15~45倍，C_d≫C_r，上式中C_r可忽略不计。为此上式经简化、积分和整理可得到求渗透系数的工作方程：

$$\frac{C_r \cdot V}{C_d \cdot A} = Pt \tag{2}$$

式(2)中V为接受室体积。由式(2)可见，方程等号左边一项与时间呈线性关系，直线的斜率P即为药物通过皮肤的渗透系数，V及A均已知，C_r及C_d为实验测得值，故以不同时间测得的C_r求出一系列C_r·V/C_d·A对t作图，拟合线性方程，方程斜率即为渗透系数。本研究全部数据均采用 Cricket 程序在 Macintosh Plus 计算机上处理并拟合线性方程。

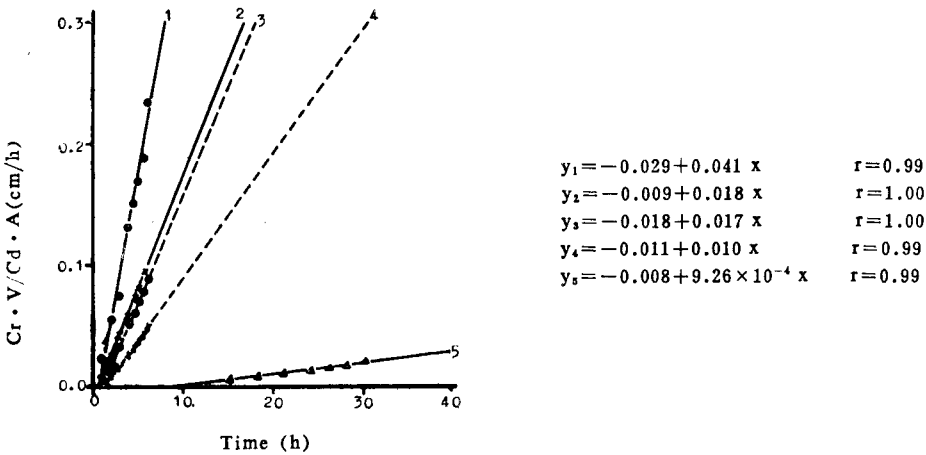


Fig 2. Effect of Azone on Ara-ADA P-value. 1. The skin pretreated with Azone for 24 h. 2,3,4. Represent the skin pretreated with Azone after 4,5,6 d respectively.

(二) 结果

图2为用Azone预处理无毛小鼠腹部皮肤24h，除去Azone后经历不同时间对Ara-ADA穿透的影响。图中1为未用Azone处理的皮肤；2为Azone预处理后立即进行扩散试验的皮肤；3，4，5分别为Azone处理后第4，5和6d的皮肤。图中各直线的斜率表明，未经Azone处理过的皮肤对Ara-ADA的穿透性最小，渗透系数为 $2.57 \times 10^{-7} \text{cm/s}$ ，而经Azone预处理24h后的皮肤渗透系数可达 $1.14 \times 10^{-5} \text{cm/s}$ ，提高了44倍。Azone预处理后经历不同时间的皮肤对Ara-ADA的穿透仍大于未处理的皮肤。图3为Azone预处理皮肤后经历不同时间的皮肤对Ara-ADA的渗透系数的对数对相应时间作图，图中横座标no

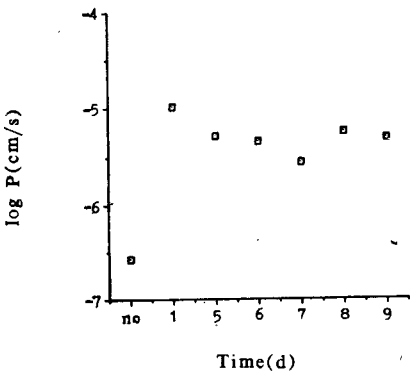


Fig 3. Relation of times after Azone-pretreatment and log P.

图后经历不同时间的皮肤对Ara-ADA的渗透系数的对数对相应时间作图，图中横座标no

代表未用 Azone 处理的皮肤; 标记 1 处表示经 Azone 处理 24 h 后的皮肤。由此图更可清楚地看出, 无毛小鼠皮肤经 Azone 预处理后, 皮肤对药物穿透的明显提高, 即使在处理后的相当长一段时间内 Azone 的作用仍可持续发挥。对用 Azone 处理一次后的皮肤, 自 d 4 起, 每天测定一批, 连续测定至 8 d, 穿透系数皆在约 $3 \times 10^{-6} \text{cm/s}$ 以上, 这表明用 Azone 预处理 4~6 周的无毛小鼠腹部皮肤 24 h, Azone 对皮肤穿透药物的促进作用至少可持续 8 d。

图 2 中各直线与时间轴的交点, 为各对应皮肤对 Ara-ADA 的扩散时滞。未用 Azone 处理的皮肤, 时滞为 8.5 h, Azone 处理后的皮肤, 时滞明显缩短, 仅为 30 min, 即使预处理后经 4~7 d 的皮肤, 扩散时滞仍小于 1 h。

讨 论

一. 据 Komada 等的研究⁽⁹⁾, Azone 预处理无毛小鼠皮肤后, 小鼠完整皮肤对 Ara-ADA 的穿透系数可提高 100 倍以上, 而本文的结论为 44 倍, 这是由于实验所用无毛小鼠的年龄不同, 前者为 8~12 周的小鼠, 完整皮肤对 Ara-ADA 的穿透系数为 $6.5 \times 10^{-8} \text{cm/s}$; 后者为 4~6 周的小鼠, 完整皮肤本身的穿透系数较大, 为 $2.57 \times 10^{-7} \text{cm/s}$ 。这表明年龄小的无毛小鼠皮肤对药物有更大的穿透性, 与以前的许多报道的结论是一致的。

二. Azone 预处理无毛小鼠皮肤后不仅大大增加药物的穿透系数, 同时值得注意的是药物通过皮肤的扩散时滞明显缩短, 这对药物使用后的立即生效是有重要意义的。

三. 实验中观察到 Azone 对 4~6 周的无毛小鼠皮肤有一定刺激作用, 在 Azone 敷贴小鼠皮肤 0.5~2 h 内, 不少小鼠骚动不安并吱叫, 个别小鼠皮肤甚至出现糜烂(实验中剔除)。作者在另一研究中用 Azone 预处理 8~12 周无毛小鼠皮肤未见以上现象, 提示 Azone 用于皮肤必须考虑年龄因素。

致谢 本文在美国犹他大学药剂学系进修期间完成, 得导师 William I. Higuchi 教授、同事 F. Komada 博士及刘溥春同志的支持和帮助。

参 考 文 献

1. Stoughton RB. Enhanced percutaneous penetration with 1-dodecylazacycloheptan-2-one. *Arch Dermatol* 1982; 118:474.
2. Stoughton RB and Meclure WO. Azone: a new non-toxic enhancer of cutaneous penetration. *Drug Dev Ind Pharm* 1983; 9:725.
3. Woodford R and Barry BW. Penetration enhancers and the percutaneous absorption of drugs: an update. *J Toxicol Cut Ocular* 1986; 5:167.
4. Morimoto Y, et al. Penetration enhancing effect of Azone on the transport of 5-fluorouracil across the hairless rat skin. *Int J Pharm* 1986; 32:31.
5. Shannon WM, et al. Influence of 1-dodecylazacycloheptan-2-one (Azone) on the topical therapy of cutaneous herpes simplex virus type 1 infection in hairless mice with 2', 3'-di-O-acetyl-9-D-arabinofuranosyladenine and 5'-O-valeryl-9-D-arabinofuranosyladenine. *J Pharm Sci* 1985; 74:1157.
6. Sheth NV, et al. The influence of Azone, propylene glycol and polyethylene glycol on *in vitro* skin penetration of trifluorothymidine. *Int J Pharm* 1986; 28:201.
7. Hosoya KI, et al. Effect of Azone on the percutaneous of 5-fluorouracil from gels in hairless rats. *Chcm Pharm Bull* 1987; 35:726.
8. Komada F, et al. Design an Ara-A transdermal delivery system for animal studies: regulation of drug concentration *in vivo*. *J Pharm Sci* In press.
9. Wotton PK, et al. Vehicle effect on topical drug delivery. Effect of Azone on the cutaneous permeation of metronizole and propylene glycol. *Int J Pharm* 1985; 24:19.

CONTINUOUS EFFECT OF AZONE PRETREATMENT ON PERMEABILITY OF ANTIVIROTIC Ara-ADA THROUGH HAIRLESS MOUSE SKIN

HN Xu

(Department of Pharmaceutics, Shanghai Medical University, Shanghai 200032)

ABSTRACT In the present studies, two chamber cells were used to measure antivirotic Ara-ADA permeability through 4~6 weeks-old hairless mouse abdominal skin pretreated with Azone for 24 hours. Continuous effect of enhanced percutaneous penetration with Azone pretreatment was studied. After skin was pretreated with Azone, permeability coefficients were determined immediately and after 4,5,6,7,8 days. The results showed that increase of Permeability coefficient reached 44 times after Azone pretreatment. The enhancement can maintain for at least 8 days and lags of diffusion time were distinctly shortened.

Key words Penetration enhancer; 1-Dodecylazacycloheptan-2-one, 2',3'-Di-O acetyl-9- β -D-arabino-furanosyl adenine