

促渗剂对左炔诺孕酮透皮性能的影响

杜洪光¹ 蔡 巍¹ 张恩宏² 张凤平¹ 蒋利剑¹ 王树明²

(1. 北京化工大学理学院, 北京 100029; 2. 北京康倍得医药技术开发有限公司, 北京 100089)

摘要: 利用改进的 Franz 扩散池考察了油酸(OA)、氮酮(azone)和肉豆蔻酸异丙酯(IPM) 3种促渗剂(PE)对左炔诺孕酮经离体鼠皮促渗性能的影响。以离体豚鼠皮肤为透皮屏障, HPLC测定左炔诺孕酮含量。结果表明, 3种促渗剂的作用机制主要是通过改变角质层的通透性, 降低了药物经皮渗透的阻力, 提高了药物在皮肤角质层的扩散系数。质量分数为7%油酸(OA)对左炔诺孕酮经皮渗透的促进效果最佳。

关键词: 透皮吸收; 高效液相色谱(HPLC); 左炔诺孕酮; 促渗剂

中图分类号: R943

引 言

左炔诺孕酮(levonorgestrel)又名保仕婷、毓婷、光字活性-18甲、左旋-18-甲基炔诺酮、左旋甲基炔诺孕酮、左旋甲炔诺酮、levonorgestrelum、postinop等,是目前国际上应用广泛的一种口服避孕药。目前国际和国内市场上已经上市的单一片剂和以左炔诺孕酮为主药的复方避孕药很多,关于左炔诺孕酮透皮贴剂(LNG-TDDS)国内外还没有上市^[1-3]。

由于其口服片的药剂量大,对肝、肾有一定的刺激作用,为了减少上述缺点,将其制成贴片,去除了肝的首过效应,避免了对肾脏的不良影响。本文考察了不同促渗剂对左炔诺孕酮体外经皮促渗性能的影响,为左炔诺孕酮的贴片研制提供了重要依据。

1 实验部分

1.1 仪器与原料

LC-2010A液相色谱仪,岛津公司;TK-60B型透皮扩散试验仪,上海锴凯科技贸易有限公司;FA1004电子天平,上海精科仪器有限公司。左炔诺孕酮标准品,99.99%,北京市药检所;左炔诺孕酮原料药(LNG),97%~103%,扬州制药厂;氮酮(azone)98.75%,分析纯,北京第二制药厂;肉豆蔻酸异丙酯(IPM),98%,分析纯,Sigma Chemical Co;油酸(OA),98%,分析纯,天津市化学试剂厂;乙醇,98%,分析纯,北京益利精细化学品有限公司;豚鼠,

200~250g,北京大学医学部动物中心提供。

1.2 高效液相色谱法(HPLC)定量分析

采用HPLC法测定LNG的含量。进行了方法专属性、线性范围、检出限、回收率及方法精密度等研究。

色谱条件: Symmetry^R色谱柱(150 mm × 3.9 mm, 5.0 μm),乙腈与水为流动相($V_{乙腈} : V_{水} = 45 : 55$),流速1.0 mL/min,柱温30℃,进样量20 μL,检测波长240 nm。

1.3 离体皮肤制备

取健康成年雄性豚鼠(200~250g),以敲颅法处死豚鼠,然后用电动剃刀剃净腹部和背部的毛,剥离背部皮肤,去净皮下脂肪,浸于生理盐水中,于4℃保存备用。

1.4 样品的制备

1.4.1 空白样品 用改进型的 Franz 扩散池的2个半池将皮肤夹住,供给池中首先加入丙二醇溶液,1h后加入体积分数为30%乙醇水溶液,得到的浸出液经0.45 μm微孔滤膜过滤。滤液作为空白样品。

1.4.2 供试样品 用改进型的 Franz 扩散池的2个半池将皮肤夹住,供给池中首先加入丙二醇溶液,1h后加入左炔诺孕酮的体积分数为30%乙醇水溶液,得到的浸出液经0.45 μm微孔滤膜过滤。滤液作为供试样品。

1.5 体外透皮实验

用改进型的 Franz 扩散池的2个半池将皮肤夹住,并以配套的铁夹夹紧2个半池,角质层面向供药池,在供药池中分别加入下列溶液:质量分数为5%

收稿日期: 2006-12-14

第一作者: 男,1963年生,教授

E-mail: dhg@mail.buct.edu.cn

的氮酮丙二醇溶液、5%的油酸丙二醇溶液、5%的肉豆蔻酸异丙酯丙二醇溶液,以丙二醇溶液作为空白对照。接收池中加入 30%乙醇水溶液作为空白接收液,搅拌速度 300 r/min。32 恒温水浴中处理豚鼠皮肤 1 h,然后将扩散池两侧的液体倒出,用 30%乙醇水溶液冲洗数次,然后在供药池中加入 83.5 $\mu\text{g/mL}$ 左炔诺孕酮的 30%乙醇过饱和水溶液 1 mL,接收池中加入空白接收液,分别于 1、2、4、8、12、24 h 取出接收液 3 mL,同时补加同体积新鲜空白接收液 3 mL 并排除空白接收液中气泡。取出溶液用 0.45 μm 微孔滤膜过滤后,并进 HPLC 进行分析。

2 结果与讨论

2.1 分析方法

2.1.1 专属性试验 分别取 1.4 节的空白样品和供试样品 20 μL 进液相色谱分析。结果表明,鼠皮浸出液中的杂质和溶剂与主药完全分离,对药品测定无干扰(图 1)。

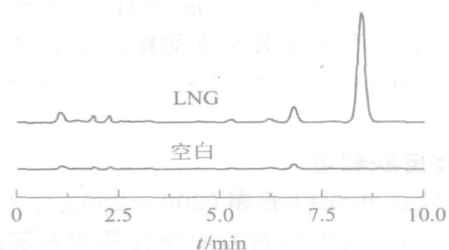


图 1 空白样品和左炔诺孕酮供试样品的色谱图

Fig. 1 HPLC traces of sample and blank

2.1.2 线性范围和检出限 精密称取 10.82 mg LNG,加入 100 mL 容量瓶中。在容量瓶用 30%的乙醇水溶液进行稀释,溶解 LNG 并稀释至刻度,配制成 108.2 $\mu\text{g/mL}$ 标准溶液母液。用流动相将母液依次稀释成 0.4328、0.6492、0.8656、1.082 和 2.164 $\mu\text{g/mL}$ 的系列标准溶液,进行高效液相色谱分析。

以 LNG 峰面积 (Y) 对浓度 ($\mu\text{g/mL}$) 做线性回归,得到线性方程为 $Y = 3.1 \times 10^4 - 1.1 \times 10^2$ 。在 0.4328 ~ 2.164 $\mu\text{g/mL}$ 的范围内呈良好的线性关系,相关系数 (r) 为 0.9996。检出限为 1.0 ng (信噪比为 3),满足定量的要求。

2.1.3 回收率试验 以 30%乙醇溶液溶解左炔诺孕酮,配制低、中和高 (0.4328、0.8656 和 2.164 $\mu\text{g/mL}$) 3 种浓度的 LNG 样品,测定回收率如表 1 所

示。

表 1 左炔诺孕酮的回收率

/ ($\mu\text{g/mL}$)	测/ ($\mu\text{g/mL}$)	回收率/ %
0.4328	0.4274 \pm 0.014	98.75 \pm 1.04
0.8656	0.8598 \pm 0.021	99.33 \pm 0.97
2.1640	2.1722 \pm 0.019	100.38 \pm 1.12

$n = 3$

2.1.4 精密度试验 配制质量浓度为 0.4328、0.8656 和 2.164 $\mu\text{g/mL}$ 的 LNG 溶液,作精密度试验。于 0.5 和 10 h 测定日内精密度 (RSD),分别于 1、2 和 3 d 测定日间精密度 (RSD)。用外标法定量。结果如表 2 所示。

表 2 左炔诺孕酮的精密度

LNG/ ($\mu\text{g/mL}$)	日内精密度/ %	日间精密度/ %
0.4328	1.11	1.60
0.8656	1.02	1.42
2.1640	1.25	1.33

$n = 3$

由表 1 可以看出,实际样品回收率为 98.75% ~ 100.38%;由表 2 可以看出,日内 RSD 为 1.02% ~ 1.25%,日间 RSD 在 1.33% ~ 1.60%。表明该方法定量准确,重现性好,可以满足体外透皮实验定量的要求。

2.2 LNG 的透皮吸收

2.2.1 促渗剂 (PE) 对左炔诺孕酮透皮吸收的影响 将 1.5 节的样品各取 20 μL 进行 HPLC 分析,测得 LNG 浓度,按下面公式计算单位面积累积透过量 (Q)。

$$Q = \frac{n \times V_0 + \sum_{i=1}^{n-1} i \times V}{A}$$

其中, n 为第 n 个取样点测得的药物浓度, $\mu\text{g/mL}$; i 为第 i 个取样点测得药物的浓度, $\mu\text{g/mL}$; A 为扩散面积, cm^2 ; V_0 为接收池中溶液的体积, mL; V 为取样体积, mL。

质量分数为 5% 的不同促渗剂对左炔诺孕酮透皮吸收的影响结果见表 3,渗透曲线见图 2。将时间与累积透皮量进行回归,求得回归方程,结果见表 4。根据直线方程可以求出药物稳态流量 (J_{ss}) 和滞后时间 (t_{lag})。渗透系数 (P_m) 等于药物稳态流量除

以供药池中药物溶液的质量浓度,增渗比(E_F)的计算以对照组左炔诺孕酮的稳态流量为参比^[4],计算结果见表 5。

表 3 左炔诺孕酮的累积释放量

Table 3 Accumulated penetration amount of levonorgestrel with different penetration enhancers

t/h	Q/($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)			
	OA	azone	IPM	空白
1	0.339 \pm 0.345	0.303 \pm 0.047	0.487 \pm 0.072	0.000 \pm 0.000
2	0.837 \pm 0.726	0.851 \pm 0.461	0.562 \pm 0.177	0.000 \pm 0.000
4	4.017 \pm 1.634	1.917 \pm 0.540	1.367 \pm 0.261	0.211 \pm 0.185
8	7.417 \pm 0.967	4.944 \pm 1.077	3.609 \pm 0.823	1.086 \pm 0.156
12	11.088 \pm 1.743	8.376 \pm 2.042	5.862 \pm 1.188	2.663 \pm 0.119
24	23.787 \pm 4.084	18.932 \pm 3.411	13.539 \pm 2.246	5.828 \pm 0.262

$n = 5 \bar{x} \pm s$

表 4 左炔诺孕酮透皮释放曲线方程

Table 4 Kinetic equation for penetration of levonorgestrel across cavy skin

PE	方程	相关系数
OA	$Q = 1.0046t - 0.5353$	0.9986
azone	$Q = 0.8240t - 0.7234$	0.9985
IPM	$Q = 0.5675t - 0.5675$	0.9959
空白	$Q = 0.2746t - 0.7885$	0.9958

表 5 左炔诺孕酮渗透参数表

Table 5 Penetration parameters for levonorgestrel across cavy skin

PE	$J_{ss}/(\mu\text{g}/(\text{h}\cdot\text{cm}^2))$	E_F	t_{lag}/h	$P_m \times 10^3$
OA	1.0046	3.66	0.5328	12.031
azone	0.8240	3.00	0.8779	9.868
IPM	0.5675	2.07	1.0000	6.796
空白	0.2746	1.00	2.8714	3.289

从表 5 的数据可知,油酸、氮酮和肉豆蔻酸异丙酯作为促渗剂对左炔诺孕酮的经皮吸收有不同的促渗作用。增渗比分别为 3.66、3.00 和 2.07。促渗剂一般通过改变药物经皮肤的扩散系数或药物在角质-基质中的分配系数而起作用。为了探讨 3 种促渗剂的作用机制,根据以上实验数据求出了经不同促渗剂处理后左炔诺孕酮在鼠皮中的表观扩散系数(D_{app})和表观分配系数(K_{app})。

表观扩散系数的计算公式^[5]为 $D_{app} = h^2/(6t_{lag})$ 。式中, h 为皮肤角质层的厚度,豚鼠的背部

皮肤近似为 $18.4\mu\text{m}$ 。表观分配系数的计算公式^[6]为 $K_{app} = P_m \times h/D_{app}$ 。

表 6 左炔诺孕酮透过豚鼠皮肤的表观扩散系数和表观分配系数表

Table 6 Apparent diffusion coefficients and SC medium partition coefficients calculated from the penetration data for levonorgestrel across cavy skin

PE	$D_{app} \times 10^{-2}$	$K_{app} \times 10^3$
OA	1.06	2.088
azone	0.64	2.837
IPM	0.56	2.233
空白	0.20	3.026

从表 6 中可以看出,油酸、氮酮和肉豆蔻酸异丙酯(质量分数为 5%)分别使左炔诺孕酮的表观扩散系数增至 5.3、3.2、2.8 倍,而表观分配系数分别降低为对照组的 69.00%、93.75%、73.79%。说明这 3 种促渗剂的作用机制主要是通过改变类脂双分子层排列,增加类脂的流动性,从而改变角质层的通透性,减小了药物经皮渗透的阻力,提高了药物在皮肤角质层的扩散系数。

2.2.2 不同浓度的油酸、氮酮对左炔诺孕酮透皮吸收的影响 考察了质量分数为 1%、3%、5%、7%、9%的油酸/丙二醇溶液及 1%、3%、5%、7%、9%的氮酮丙二醇溶液对左炔诺孕酮透皮吸收的影响。制备方法与 1.5 节中的相同,测定与计算方法同 2.2.1 节中的内容。

不同浓度的油酸、氮酮经过豚鼠皮肤后,左炔诺孕酮药物的释放曲线分别见图 2、3。

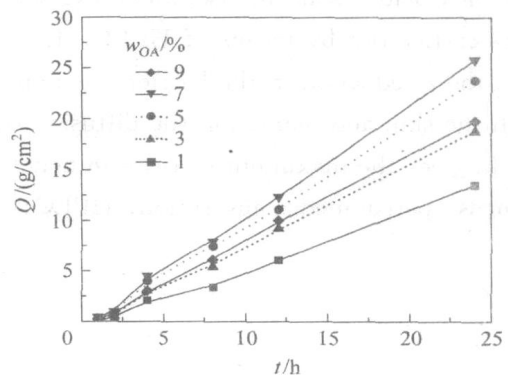


图 2 不同浓度油酸的释放曲线

Fig. 2 Penetration kinetic curves for levonorgestrel across cavy skin with different concentrations of OA

由图 2、3 可知,质量分数为 1%~9%的油酸丙

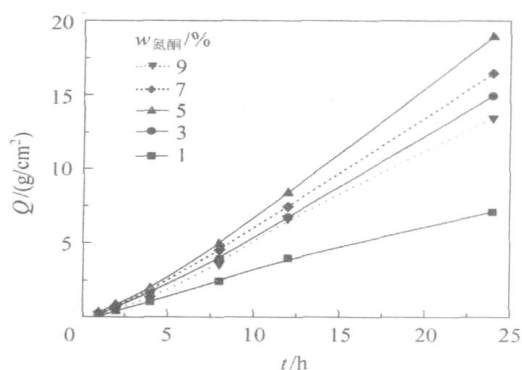


图3 不同浓度氮酮的释放曲线

Fig. 3 Penetration kinetic curves of levonorgestrel across cavy skin with different concentrations of azone

二醇溶液和氮酮丙二醇溶液对左炔诺孕酮均有促渗作用。在 1% ~ 5% 的范围内,随着促渗剂浓度的增加,促渗效果增强,但油酸在 9% 时促渗效果降低,氮酮在 7% 时促渗效果降低。综上所述,质量分数为 7% 的油酸丙二醇溶液对左炔诺孕酮的透皮促渗效果最佳。

参考文献:

- [1] 梁秉文,梁文权,平其能,等. 经皮给药制剂 [M]. 北京:中国医药科技出版社,1992: 178.
- [2] 崔福德,陆彬,张强,等. 药剂学 [M]. 5 版. 北京:人民卫生出版社,2004: 425.
- [3] 国家食品药品监督管理局药品药评审中心,四川美康医药软件研究开发有限公司. 物临床信息参考 [M]. 成都:四川科学技术出版社,2004: 602.
- [4] 郑俊民,李启先,丁平田,等. 经皮给药新剂型 [M]. 北京:人民卫生出版社,1997: 13.
- [5] BRONAUGH R L, STEWART R F, CONGDON E R. Method for *in vitro* percutaneous absorption studies. Animal model for human skin [J]. Toxicology Applied Pharmacology, 1982, 62(3): 481 - 488.
- [6] HARRISON J E, WATKINSON A C, GREEN D M, et al. The relative effect of azone and transdeutol on permeant diffusivity and solubility in human stratum corneum [J]. Pharmaceutical Research, 1996, 13(4): 542 - 546.

Effect of enhancers on percutaneous absorption of levonorgestrel across excised cavy skin

DU HongGuang¹ CAI Wei¹ ZHANG EnHong² ZHANG FengPing¹
JIANG LiJian¹ WANG ShuMing²

(1. School of Science, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029;

2. Beijing KBD Pharmaceutical Technology Development Co Ltd, Beijing 100089, China)

Abstract: The *in vitro* permeability of levonorgestrel across excised cavy skin treated with the penetration enhancers oleic acid, azone and isopropyl myristate has been studied using modified Franz diffusion cells. The analysis was carried out by means of HPLC. It was found that the action of the three skin penetration enhancers leads to the a reduction in the barrier function of stratum cornea, thus reducing the resistance to drug transport through the skin and increasing the diffusion coefficient of levonorgestrel. It was found that addition of 7% of oleic acid gives the maximum increase in penetration of levonorgestrel across cavy skin.

Key words: percutaneous absorption; HPLC; levonorgestrel; penetration enhancers