



中国实验方剂学杂志

Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae

ISSN 1005-9903, CN 11-3495/R

## 《中国实验方剂学杂志》网络首发论文

题目：电致孔方式对盐酸青藤碱经皮渗透的促进作用  
作者：鄢森，滕健，孙彤彤，许李，仇萍，汪晴  
DOI：10.13422/j.cnki.syfjx.20211448  
收稿日期：2020-12-24  
网络首发日期：2021-04-07  
引用格式：鄢森，滕健，孙彤彤，许李，仇萍，汪晴．电致孔方式对盐酸青藤碱经皮渗透的促进作用．中国实验方剂学杂志．  
<https://doi.org/10.13422/j.cnki.syfjx.20211448>



**网络首发：**在编辑部工作流程中，稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定，且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式（包括网络呈现版式）排版后的稿件，可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定；学术研究成果具有创新性、科学性和先进性，符合编辑部对刊文的录用要求，不存在学术不端行为及其他侵权行为；稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准，正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性，录用定稿一经发布，不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容，只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

**出版确认：**纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊（光盘版）》电子杂志社有限公司签约，在《中国学术期刊（网络版）》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版，以单篇或整期出版形式，在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊（网络版）》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物（ISSN 2096-4188，CN 11-6037/Z），所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

[收稿日期]2020-12-24 (007)  
[基金项目]湖南省科技创新重大项目 (2020SK1020)  
[第一作者]鄢森, 在读硕士, 从事经皮给药制剂研究, E-mail: yansen\_dlut@126.com  
[通信作者]汪晴, 博士, 教授, 博士生导师, 从事经皮给药及经黏膜给药系统的研究与相关制剂的开发, Tel: 0411-84986176, E-mail: qwang@dlut.edu.cn

# 电致孔方式对盐酸青藤碱经皮渗透的促进作用

鄢森<sup>1</sup>, 滕健<sup>2</sup>, 孙彤彤<sup>3</sup>, 许李<sup>2</sup>, 仇萍<sup>2</sup>, 汪晴<sup>1\*</sup>

(1.大连理工大学 化工学院, 精细化工国家重点实验室, 辽宁 大连 116024; 2.湖南正清制药集团股份有限公司, 湖南 怀化 418005; 3.大连科翔科技开发有限公司, 辽宁 大连 116024)

**[摘要]** 目的: 考察盐酸青藤碱 (SNH) 的经皮渗透性, 并通过优化电致孔参数以达到对 SNH 最佳促渗作用。方法: 采用体外扩散池法研究 SNH 的经皮渗透性及电致孔的促渗作用, 并通过小鼠在体试验进一步评估电致孔的促渗效果。结果: 在稳态条件下, SNH 在裸鼠去角质皮肤和全皮中的渗透速率分别为  $(385.81 \pm 12.88)$ ,  $(0.88 \pm 0.20) \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ , 去角质皮肤中的渗透速率约为全皮中的 438 倍; 渗透动力学分析结果表明, SNH 在角质层中的溶解度和扩散系数都较低, 分别为  $(70.82 \pm 9.63) \times 10^3 \text{ g m}^{-3}$  和  $(3.07 \pm 1.52) \times 10^{-14} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ ; 在优化的电致孔条件 (电压 72 V, 时间 60 min) 下, SNH 在小鼠皮肤中的 24 h 累积渗透量达到  $(10\,008.39 \pm 1\,961.57) \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ , 稳态渗透速率达  $(456.01 \pm 51.26) \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ , 与空白组相比分别提高了 5.4 倍和 5.1 倍, 皮肤和肌肉中 SNH 的滞留量分别为空白组的 2.0 倍和 1.5 倍。结论: SNH 在角质层中较低的溶解度和扩散系数是阻碍其经皮渗透的主要因素, 电致孔可显著提高 SNH 的经皮渗透, 并可以增加 SNH 在小鼠皮肤和肌肉中的滞留量。

**[关键词]** 盐酸青藤碱; 体外渗透; 电致孔; 全皮; 去角质皮肤; 体外扩散池法  
**[中图分类号]** O552.2; R94; R28; O657.7 **[文献标识码]** A  
**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20211448  
**[网络出版地址]**  
**[网络出版时间]**

## Effect of Electroporation on Percutaneous Permeation of Sinomenine Hydrochloride

YAN Sen<sup>1</sup>, TENG Jian<sup>2</sup>, SUN Tong-tong<sup>3</sup>, XU Li<sup>2</sup>, QIU Ping<sup>2</sup>, WANG Qing<sup>1\*</sup>

(1.State Key Laboratory of Fine Chemicals, School of Chemical Engineering, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China; 2.Hunan Zhengqing Pharmaceutical Group Co. Ltd., Huaihua 418005, China; 3.Dalian Kexiang Technology Development Co. Ltd., Dalian 116024, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the percutaneous permeability of sinomenine hydrochloride (SNH) and optimize the parameters of electroporation to achieve the best permeation enhancing effect on SNH. **Method:** The percutaneous permeability of SNH and the enhancement effect of electroporation were studied by *in vitro* diffusion cell method, and the enhancement effect of electroporation was further evaluated by *in vivo* study in mice. **Result:** Under steady-state condition, the permeation rates of SNH in stripped skin and intact skin of hairless mice were  $(385.81 \pm 12.88)$ ,  $(0.88 \pm 0.20) \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ , respectively. The permeation rate in stripped skin was 438 times higher than that in intact skin. The results of percutaneous permeation kinetics analysis showed that the solubility and diffusion coefficient of SNH in stratum corneum were relatively low, which were  $(70.82 \pm 9.63) \times 10^3 \text{ g m}^{-3}$  and  $(3.07 \pm 1.52) \times 10^{-14} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ , respectively. Under the optimized electroporation conditions (voltage of 72 V, time of 60 min), the 24 h cumulative permeation amount of SNH through skin of mice was  $(10\,008.39 \pm 1\,961.57) \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ , and the steady-state permeation rate was  $(456.01 \pm 51.26) \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ , which were 5.4 times and 5.1 times higher than those of blank group, respectively. *In vivo* studies in mice showed that the contents of SNH in skin and muscle of electroporation group were 2.0 times and 1.5 times higher than those of blank group. **Conclusion:** The low solubility and low diffusion coefficient of SNH in the stratum corneum are the main factors hindering the percutaneous permeation of SNH. Electroporation can significantly increase the percutaneous permeation of SNH and its retention in skin and muscle of mice.

**[Key words]** sinomenine hydrochloride; percutaneous permeation *in vitro*; electroporation; intact skin; stripped skin; *in vitro* diffusion cell method

青藤碱 (SN) 是从清风藤中提取分离得到的一种生物碱单体, 具有抗炎、镇痛和免疫抑制等作用<sup>[1-2]</sup>。正清风痛宁注射液是临床上用于治疗风湿及类风湿性关节炎的常用制剂, 其有效成分为盐酸青藤碱 (SNH), 但在临床使用过程中患者依从性较差。经皮给药可以使药物以一定速率通过皮肤, 经皮下毛细血管吸收进入体循环或者直达皮下局部组织器官病灶, 从而起到全身或局部治疗作用。相比于其他给药方式, 经皮给药能够避免肝脏首过效应和胃肠道或局部肌肉的刺激性, 提高患者的依从性<sup>[3]</sup>。经皮递送 SNH 是一种无痛稳定的给药方式, 能使 SNH 富集于皮下局部组织病灶, 同时减少各种全身不良反应<sup>[4]</sup>。但 SNH 较低的经皮渗透能力是限制其在皮肤局部应用的主要障碍<sup>[5-6]</sup>。

改善药物的经皮渗透性,通常采用化学促渗法和/或物理促渗法。化学促渗法是通过加入化学促渗剂来提高药物制剂的释放度或渗透性的有效方法。杨永钢等<sup>[6]</sup>制备了一种含有 10%肉豆蔻酸异丙酯和 5%薄荷醇的 SN 透皮贴片, SN 经大鼠皮肤的稳态渗透速率为  $(24.16 \pm 1.46) \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ , 24 h 累积透过量比不含有促渗剂的贴片提高了 8.22 倍,但达到有效治疗浓度仍需较长时间。电致孔法(EP)作为物理促渗方法的一种,被越来越广泛地应用于经皮给药中。该技术主要是采用瞬时电脉冲作用于表皮,有研究证明,EP 使角质层(SC)内产生了直径 10 nm 以下可逆的亲水性孔道,降低了药物在 SC 中的扩散阻碍<sup>[7-8]</sup>。李凡等<sup>[9]</sup>采用 EP 技术促进 SN 巴布剂的经皮渗透,研究结果表明在家兔体内实验中,药时曲线下面积( $\text{AUC}_{0-\infty}$ )为被动扩散的 1.32 倍,药峰浓度( $C_{\text{max}}$ )为被动扩散的 1.24 倍,达峰时间( $t_{\text{max}}$ )比被动扩散提前 4 h,证明 EP 能够提高 SN 透皮吸收的速度和程度。说明 EP 的应用可以缩短给药时间,使药物快速穿过皮肤<sup>[8]</sup>,提高生物利用度。

目前已有研究证明了 EP 对 SNH 的促渗作用,但皮肤对 EP 电压和电流的耐受能力是有限的,较高的电压和电流会影响 SNH 经皮给药的安全性<sup>[10-12]</sup>。因此,本研究拟采用体外经皮渗透试验和渗透动力学分析方法,考察并分析 SNH 经皮渗透能力低下的原因,在此基础上,运用电子脉冲治疗仪研究不同参数条件下 EP 对 SNH 体外经皮渗透的影响,评价其在体试验的有效性和安全性,旨在开发出一种 EP 促进 SNH 经皮渗透的新方法。

## 1 材料

LC-20AT 型高效液相色谱仪(日本岛津公司),FSH-2 型可调高速匀浆机(金坛市宏华仪器厂),KX-V/HDP 数控型体外经皮渗透试验系统(大连科翔科技开发有限公司),BSA124S 型 1/1 万电子天平和 SOP 型 1/10 万电子天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司],CHY-5 型测厚仪(济南三泉中石实验仪器有限公司),LHJ-IX 型电子脉冲治疗仪(长沙原道医药科技开发有限公司)。

SNH 原料药、正清风痛宁注射液(湖南正清制药集团股份有限公司,批号分别为 YK-190509,1907401),SN 对照品(中国食品药品检定研究院,批号 110774-201808,纯度 94.6%),磷酸二氢钠、水合氯醛和聚乙二醇(PEG)400(国药集团化学试剂有限公司,批号分别为 20160323,20180912,20180808),水为娃哈哈纯净水,甲醇、乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

雄性昆明种小鼠和 BALB/c-nu 裸鼠,SPF 级,体质量均为  $(20 \pm 2) \text{ g}$ ,购自辽宁长生生物技术股份有限公司,许可证号 SCXK(辽)2020-0001。本文涉及的动物实验经大连理工大学生物与医学伦理委员会批准,批准号 2021-059。实验前动物于大连理工大学药理学系 SPF 级动物房内适应性饲养 1 周。

## 2 方法与结果

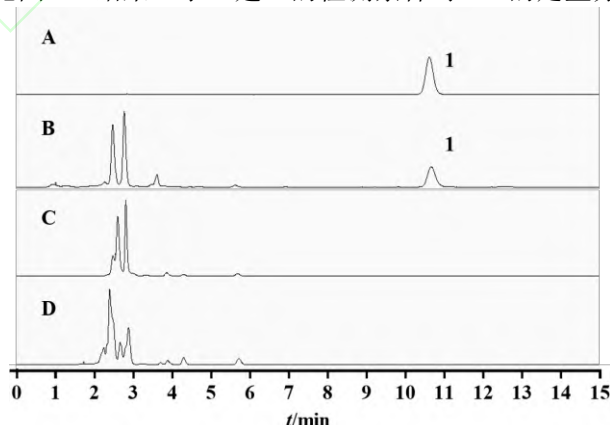
### 2.1 高效液相色谱法(HPLC)的建立

2.1.1 色谱条件 InterSustain® C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5  $\mu\text{m}$ ),流动相乙腈-0.78%磷酸二氢钠溶液(12:88),检测波长 265 nm,流速 1.0 mL min<sup>-1</sup>,柱温 30  $^{\circ}\text{C}$ ,进样量 5  $\mu\text{L}$ 。

2.1.2 对照品溶液的配制 精密称定 SN 对照品 18.92 mg,加入适量甲醇,超声使溶解(功率 200 W,频率 53 kHz,下同),放冷后用甲醇定容至 50 mL,得 378.4 mg L<sup>-1</sup>对照品贮备液;用 2.1.1 项下流动相将贮备液分别稀释成系列质量浓度(0.473, 0.946, 1.892, 9.46, 18.92, 47.3, 94.6, 189.2 mg L<sup>-1</sup>)的对照品溶液。

2.1.3 线性关系考察 使用 2.1 项下系列质量浓度的对照品溶液,按 2.1.1 项下色谱条件检测,以峰面积为纵坐标,SN 质量浓度为横坐标,进行线性回归,得回归方程  $Y = 5023.61X + 316.279$  ( $R^2 = 0.9999$ ),线性范围 0.473~378.4 mg L<sup>-1</sup>。

2.1.4 专属性考察 使用小鼠皮肤的甲醇提取液,2.1 项下配制的 SN 对照品溶液和空白接受液,按 2.1.1 项下色谱条件进行检测,色谱图见图 1。结果显示,建立的检测条件对 SN 的定量分析无干扰。



A.对照品; B.供试品; C.空白接受液; D.小鼠皮肤甲醇提取液; 1.SN

图 1 24 h 后接受液中 SNH 的 HPLC

Fig. 1 HPLC of SNH in receiving liquid after 24 h

2.2 表观油水分配系数的测定 取适量 SNH 加至 2 mL 正辛醇饱和的水溶液中, 使其完全溶解, 加入水饱和和正辛醇 2 mL, 于  $(25 \pm 0.5)^\circ\text{C}$  下磁力搅拌 24 h, 经  $1 \text{万 r min}^{-1}$  离心 10 min (离心半径 6 cm, 下同), 分离出油相和水相, 并分别经适当稀释后按照 2.1.1 项下色谱条件测定 ( $n=6$ ), 按公式  $\lg P = \lg (C_o/C_w)$  计算油水分配系数 ( $P$ ), 式中  $C_o$  为平衡后正辛醇相中药物质量浓度,  $C_w$  为平衡后水相中药物质量浓度。结果 SNH 的  $\lg P = -2.04 \pm 0.04$ , 表明该药物亲水性强。

### 2.3 离体皮肤的制备<sup>[13]</sup>

2.3.1 小鼠和裸鼠全皮 采用脱颈法处死小鼠和/或裸鼠, 剔除小鼠背部毛发, 迅速剥离小鼠和/或裸鼠背部皮肤, 去除皮下脂肪和结缔组织, 裁剪成  $2 \text{ cm} \times 2 \text{ cm}$  面积的小块, 确保皮肤 SC 完整不被损坏, 塑封包装后于  $-80^\circ\text{C}$  保存, 1 个月内使用。使用前, 皮肤于  $4^\circ\text{C}$  条件下解冻后恢复至室温并测量其厚度。

2.3.2 裸鼠去角质皮肤 裸鼠全皮解冻并恢复至室温后, 采用胶带剥离法除去裸鼠皮肤 SC, 剥离 30 次以确保 SC 完全去除, 并测量去角质皮肤的厚度。

### 2.4 SNH 经皮渗透动力学研究

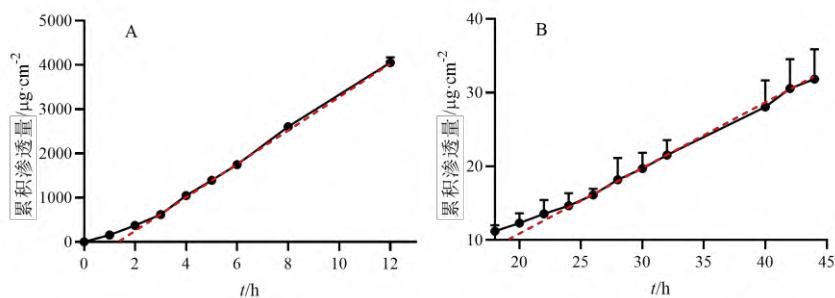
2.4.1 供给液与接受液 将过量的 SNH 加至 40% PEG400 水溶液中,  $37^\circ\text{C}$  下磁力搅拌 24 h, 制成饱和溶液, 得供给液。接受液为 40% PEG400 水溶液。

2.4.2 SNH 在皮肤匀浆中稳定性考察 取 2.3 项下裸鼠全皮, 剪碎后置于 10 mL 离心管中, 加入 40% PEG400 水溶液 1 mL, 使用高速匀浆机于  $1 \text{万 r min}^{-1}$  匀浆 10 min 将皮肤打碎, 补充加入 40% PEG400 水溶液 4 mL, 于  $37^\circ\text{C}$  下孵育 30 min 使皮肤中酶游离, 于  $3000 \text{ r min}^{-1}$  离心 10 min, 取上清液, 经  $0.45 \mu\text{m}$  微孔滤膜滤过, 作为溶剂。向其中加入一定量 SNH, 振荡使药物充分溶解及混合, 置于  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$  水浴条件下, 分别于 0, 3, 6, 9, 12, 24, 30, 36, 48 h 取样 0.2 mL, 按 2.1.1 项下色谱条件测定, 计算 48 h 内 SNH 峰面积的 RSD 0.8%, 说明 SNH 在该实验条件下 48 h 内稳定性良好。

2.4.3 体外渗透研究<sup>[14]</sup> 将 2.3 项下裸鼠全皮和去角质皮肤固定在水平双室扩散池的供给室和接受室之间 (SC 面向供给室), 加入供给液 [SNH 溶解度为  $(92.36 \pm 0.54) \text{ g L}^{-1}$ ] 和接受液。实验过程中控制温度为  $(37 \pm 0.2)^\circ\text{C}$ , 于  $(600 \pm 6) \text{ r min}^{-1}$  磁力搅拌, 并确保在实验过程中供给室内药物溶液处于饱和状态 (一直有未溶解的药物存在)。根据体外渗透预试验结果, 在稳态渗透条件下, 全皮组分别于 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 37, 40, 42, 44 h 从接受室中取样 1 mL; 去角质皮肤组分别于 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 12 h 从接受室中取样 1 mL, 均补加等温等体积的空白接受液, 平行 3 组。按 2.1.1 项下色谱条件测定, 按  $Q = (C_n V + V_0 \sum_{i=1}^n C_i)$

/A 计算单位面积累积渗透量 ( $Q, \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ ), 式中  $C_n$  和  $C_i$  分别为第  $n, i$  个取样点测得的药物质量浓度 ( $\text{mg L}^{-1}$ ),  $V$  为接受室体积 (12 mL),  $V_0$  为单次取样体积 (1.0 mL),  $A$  为渗透面积 ( $1.77 \text{ cm}^2$ )。绘制  $Q$ -时间 ( $Q$ - $t$ ) 曲线。在  $Q$ - $t$  曲线中, 稳态部分拟合直线斜率为稳态渗透速率 ( $J$ ), 该直线与横坐标的截距为时滞 ( $t_{\text{lag}}$ )。

按公式  $C_s = 6t_{\text{lag},w} (1 - 3\tau + 2\eta\tau) (dQ/dt)_w / [(1 + 2\eta)(1 - \eta)h_s]$ ,  $C_v = 6t_{\text{lag},v} (dQ/dt)_v / h_v$ ,  $D_s = h_s (dQ/dt)_w / C_s / (1 - \eta)$ ,  $D_v = 6t_v (dQ/dt)_v / C_v$ ,  $\eta = (dQ/dt)_w / (dQ/dt)_v$ ,  $\tau = t_{\text{lag},v} / t_{\text{lag},w}$ ,  $K_{s/v} = C_s / C_v$  计算 SNH 经皮渗透动力学参数<sup>[15]</sup>。式中  $D$  和  $K$  分别为扩散系数和分配系数,  $C$  为药物质量浓度 ( $\text{g L}^{-1}$ ),  $h$  为皮肤厚度 (cm),  $\eta$  为药物在全皮和去角质皮肤中稳态渗透速率之比,  $\tau$  为药物在去角质皮肤和全皮中时滞之比; 下标  $s, w, v$  分别指 SC, 全皮和去角质皮肤。SNH 饱和溶液的体外经皮渗透曲线见图 2。SNH 经去角质皮肤的  $Q_{12 \text{ h}}$  和经全皮的  $Q_{44 \text{ h}}$  分别为  $(4058.15 \pm 119.41)$ ,  $(31.84 \pm 4.04) \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ , 稳态渗透速率 ( $J_v$  和  $J_w$ ) 分别为  $(385.81 \pm 12.88)$ ,  $(0.88 \pm 0.20) \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$ , 均呈现显著性差异 ( $P < 0.001$ ), 说明 SC 是药物经皮渗透的主要屏障。SNH 在 SC 和去角质皮肤中扩散系数 ( $D_s$  和  $D_v$ ) 分别为  $(3.07 \pm 1.52) \times 10^{-14}$ ,  $(1.25 \pm 0.31) \times 10^{-12} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ ,  $D_v$  高于  $D_s$  约 2 个数量级, 表明 SNH 在 SC 中较低的扩散性是形成 SC 屏障的主要原因。此外, SNH 在 SC 中溶解度 ( $C_s$ ) 仅  $(70.82 \pm 9.63) \times 10^3 \text{ g m}^{-3}$ , 也可能在一定程度上阻碍了药物经皮渗透。另一方面, SNH 的 SC 与活性表皮之间的分配系数 ( $K_{s/v}$ ) 为 0.004, 表明强亲水性的 SNH 更容易从 SC 分配进入活性表皮。



A.去角质皮肤；B.全皮

图2 SNH饱和溶液透过裸鼠皮肤的体外渗透曲线 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

Fig. 2 *In vitro* permeation profiles of SNH saturated solution through hairless mouse skin ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

2.5 EP体外促渗研究 根据2.4项下研究结果, SNH经皮渗透能力较低的原因之一是药物在SC中扩散系数过低, 因此, 拟采用EP提高SNH在SC中的扩散能力。

2.5.1 EP施加方式考察 将2.3项下小鼠皮肤固定在立式扩散池的供给室和接受室之间(SC面朝上), 电子脉冲治疗仪调节电压90 V, 设置EP时间60 min, 分别考察EP不同施加方式对SNH经皮渗透的影响。实验装置示意图见图3。

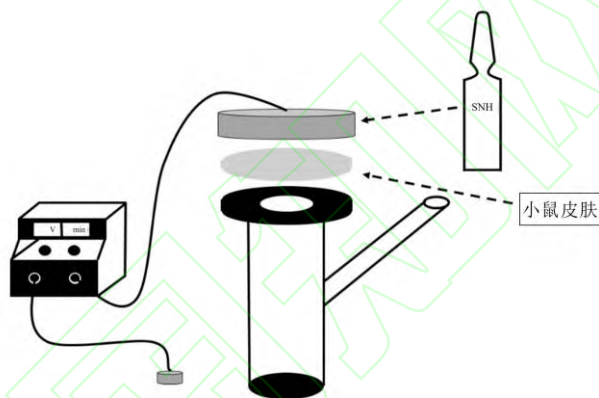


图3 电致孔实验装置示意

Fig. 3 Experimental device of electroporation

方法一为EP预处理皮肤, 然后立即撤去电子脉冲治疗仪, 向供给室中加入1支正清风痛宁注射液(规格50 mg; 2 mL)作为供给液; 方法二为EP与SNH同时应用于皮肤(同时处理组), 即将供给液加入到皮肤电极中进行EP促渗。接受液均为40% PEG400水溶液, 在 $(600 \pm 6) \text{ r min}^{-1}$ 转速的磁力搅拌和 $(37 \pm 0.2) ^\circ\text{C}$ 条件下进行实验。在预定的时间点(1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 h)从接受室中取样0.2 mL并补加等温等体积的空白接受液, 平行3组。按2.1.1项下色谱条件测定, 计算 $Q$ , 绘制 $Q-t$ 曲线, 见表1和图4。结果与空白组比较, EP预处理皮肤组的 $Q_{24\text{h}}$ 和 $J$ 略有增加, 但无显著性差异, 而同时处理组则显著增加( $P < 0.01$ ), 说明EP对SNH经皮渗透有显著促渗作用。

表1 电致孔不同施加方式下SNH的经皮渗透参数比较 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

Table 1 Comparison of percutaneous permeability parameters of electroporation with different application methods ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

| 组别   | $Q_{24\text{h}}/\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ | $J/\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ | $t_{\text{lag}}/\text{h}$ |
|------|---------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|---------------------------|
| 空白   | $1840.17 \pm 146.96$                              | $89.28 \pm 8.00$                                         | $3.39 \pm 0.23$           |
| 预处理  | $2426.60 \pm 359.20$                              | $105.94 \pm 6.30$                                        | $1.07 \pm 0.19^{1)}$      |
| 同时处理 | $7768.18 \pm 1095.53^{2)}$                        | $325.00 \pm 42.00^{2)}$                                  | $1.07 \pm 0.19^{1)}$      |

注: 与空白组比较  $^{1)} P < 0.05$ ,  $^{2)} P < 0.01$  (表2, 3同)。

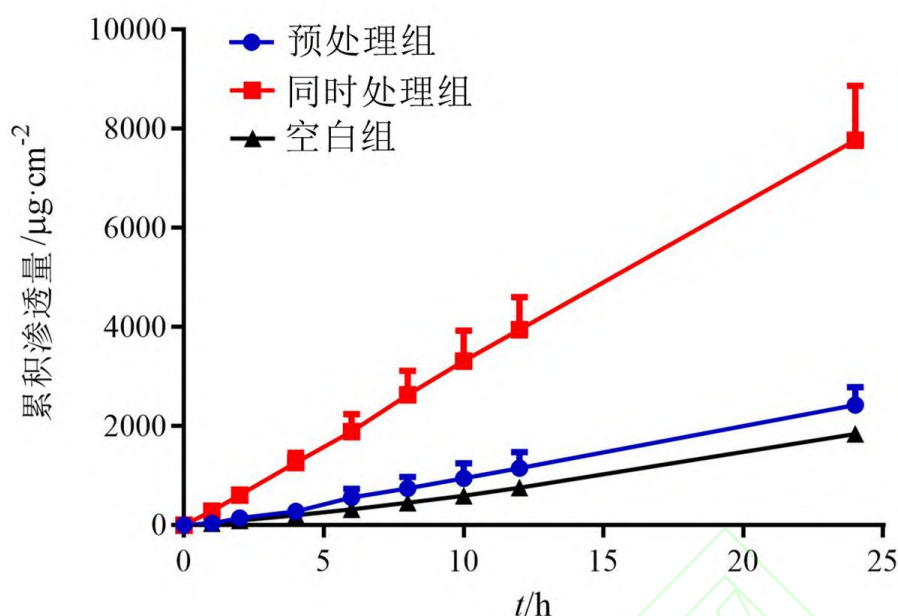


图4 不同电致孔施加方式下 SNH 的经皮渗透行为 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

Fig. 4 Percutaneous permeation behaviors of SNH with different electroporation methods ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

2.5.2 EP 电压参数考察 采用 EP 与 SNH 同时应用于皮肤表面的方式, 考察不同电压参数的影响。分别设定 EP 电压为 0, 18, 36, 54, 72, 90 V, EP 施加时间均为 60 min, 其余条件和方法同 2.5.1 项, 见图 5 和表 2。结果发现随着电压的升高, SNH 的  $Q_{24h}$  和  $J$  随之先增大后降低; 与空白组比较, 当电压  $\geq 18$  V 时显示出显著性差异 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 当电压为 72 V 时,  $Q_{24h}$  和  $J$  均达到最大值; EP 对人体皮肤的安全电压阈值为 300 V<sup>[16]</sup>, 因此, 选择电压参数为 72 V 进行后续研究可以同时满足安全性和有效性的要求。

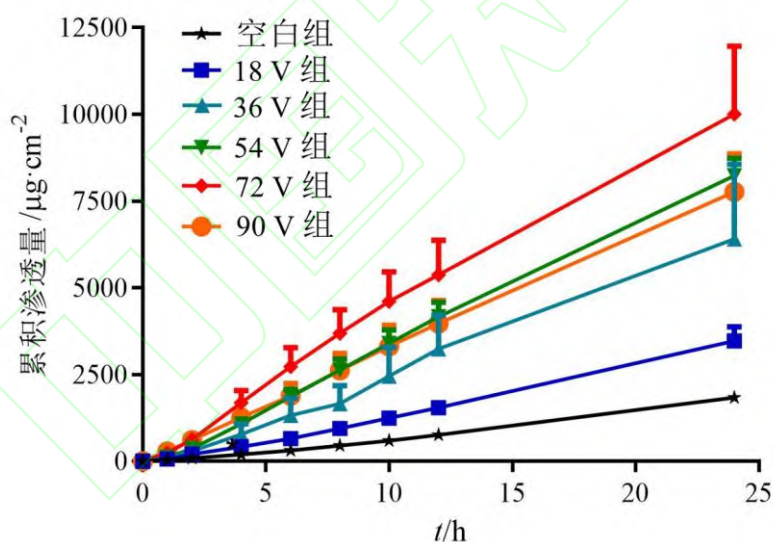


图5 不同电致孔电压参数下 SNH 的经皮渗透行为 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

Fig. 5 Percutaneous permeation behaviors of SNH with different voltage parameters of electroporation ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

表2 电致孔不同电压参数下 SNH 的经皮渗透参数 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

Table 2 Percutaneous permeation parameters of SNH with different voltage parameters of electroporation ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

| 组别   | $Q_{24h}/\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ | $J/\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\text{h}^{-1}$ | $t_{lag}/\text{h}$            |
|------|------------------------------------------|-------------------------------------------------|-------------------------------|
| 空白   | 1 840.17 $\pm$ 146.96                    | 89.28 $\pm$ 8.00                                | 3.39 $\pm$ 0.23               |
| 18 V | 3 469.90 $\pm$ 408.63 <sup>1)</sup>      | 157.05 $\pm$ 16.83 <sup>2)</sup>                | 1.97 $\pm$ 0.42 <sup>1)</sup> |
| 36 V | 6 411.82 $\pm$ 2 151.80 <sup>1)</sup>    | 288.92 $\pm$ 29.63 <sup>2)</sup>                | 1.70 $\pm$ 0.34 <sup>1)</sup> |
| 54 V | 8 233.59 $\pm$ 503.01 <sup>2)</sup>      | 351.06 $\pm$ 40.58 <sup>2)</sup>                | 0.45 $\pm$ 0.22 <sup>2)</sup> |

|      |                                  |                            |                         |
|------|----------------------------------|----------------------------|-------------------------|
| 72 V | 10 008.39±1 961.57 <sup>2)</sup> | 456.01±51.26 <sup>2)</sup> | 0.10±0.05 <sup>2)</sup> |
| 90 V | 7 768.17±1 095.58 <sup>2)</sup>  | 325.00±49.88 <sup>2)</sup> | 0.10±0.03 <sup>2)</sup> |

2.5.3 EP 时间参数考察 采用上述优化实验条件考察 EP 施加时间对 SNH 经皮渗透的影响。分别设定 EP 施加时间为 0, 20, 40, 60 min, 其余条件和方法同 2.5.1 项, 见表 3。结果发现与空白组相比, EP 施加时间超过 40 min 时, SNH 的  $Q_{24\text{ h}}$  和  $J$  呈现显著性差异 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), 其中当时间为 60 min 时 SNH 的  $Q_{24\text{ h}}$  和  $J$  分别增加了 5.4, 5.1 倍; 同时, 为了保证安全性, 在经皮给药时 EP 的连续使用一般不超过 60 min。由此, 筛选出最佳的 EP 施加时间为 60 min。

表 3 电致孔不同施加时间下 SNH 的经皮渗透参数 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

Table 3 Percutaneous permeation parameters of SNH with different application times of electroporation ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

| 组别     | $Q_{24\text{ h}}/\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ | $J/\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\text{ h}^{-1}$ |
|--------|--------------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| 空白     | 1 840.17±146.96                                  | 89.28±8.00                                       |
| 20 min | 2 416.75±714.64                                  | 103.43±18.96                                     |
| 40 min | 3 590.18±570.95 <sup>1)</sup>                    | 155.71±25.67 <sup>2)</sup>                       |
| 60 min | 10 008.39±1 961.57 <sup>2)</sup>                 | 456.01±51.26 <sup>2)</sup>                       |

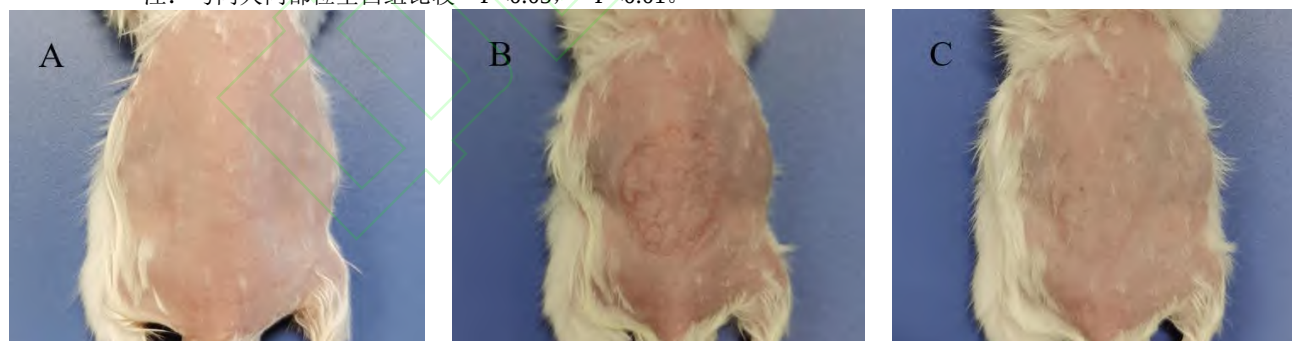
2.6 EP 在体促渗试验 基于 EP 体外促渗优化条件, 选择小鼠进行在体促渗试验。腹腔注射 4%水合氯醛麻醉小鼠, 剔除背部毛发, 将皮肤电极固定于小鼠背部无毛区域, SNH 给药剂量  $50\text{ mg kg}^{-1}$ [17]。EP 施加电压 72 V, 施加时间 60 min。按照临床常见给药频率, 每日给药 1 次, 分别考察给药 1, 2, 3 d 后皮肤和肌肉中药物质量浓度和皮肤状态变化情况, 平行 6 组。皮肤给药 60 min 后, 立即取下给药区域皮肤和肌肉, 剪碎后加入甲醇 1 mL, 超声 60 min, 经  $0.45\text{ }\mu\text{m}$  微孔滤膜滤过, 按 2.1.1 项下色谱条件测定, 见表 4。结果发现给药 1 d 时, 采用 EP 皮肤给药能显著提高小鼠皮肤和肌肉中 SNH 的滞留量 ( $P<0.05$ ), 分别为空白组的 2.0, 1.5 倍; 连续多天给药组显示出相似的增强效果, 且未产生皮肤中的药物累积, 推测在小鼠体内, 药物 24 h 内可被代谢, 这与 SNH 较短的半衰期 (5~6 h) 一致[18]。在本实验条件下, 观测小鼠皮肤的变化情况, 在体施加 EP 后, 小鼠皮肤可以在短时间内恢复正常状态, 且未出现皮肤红肿、破损等现象, 见图 6。

表 4 电致孔介导下小鼠在体皮肤和肌肉中 SNH 滞留量 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ )

Table 4 SNH retention in skin and muscle of mice mediated by electroporation *in vivo* ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ )  $\mu\text{g cm}^{-2}$

| 组别  | 给药 1 d                  |                         | 给药 2 d                  |           | 给药 3 d                  |                         |
|-----|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-----------|-------------------------|-------------------------|
|     | 皮肤                      | 肌肉                      | 皮肤                      | 肌肉        | 皮肤                      | 肌肉                      |
| 空白  | 3.03±0.47               | 1.82±0.14               | 2.61±1.45               | 1.87±0.78 | 3.64±0.88               | 1.98±0.10               |
| 电致孔 | 6.20±0.91 <sup>1)</sup> | 2.82±0.13 <sup>1)</sup> | 5.43±0.38 <sup>1)</sup> | 2.84±0.16 | 6.94±0.18 <sup>2)</sup> | 2.70±0.11 <sup>1)</sup> |

注: 与同天同部位空白组比较 <sup>1)</sup>  $P<0.05$ , <sup>2)</sup>  $P<0.01$ 。



A.EP 皮肤给药前; B.EP 皮肤给药结束后; C.EP 皮肤给药结束后 1 h

图 6 小鼠皮肤在体施加 EP 前后皮肤状态

Fig. 6 Skin state of mice before and after electroporation was applied *in vivo*

### 3 讨论

本文通过 SNH 小鼠体外经皮渗透试验和在体试验评估 EP 对 SNH 的经皮促渗作用。由体外渗透性研究结果可见, SNH 经全皮的  $Q$  远低于去角质皮肤, 同时对 SNH 经皮渗透动力学参数分析可知, 在渗透过程中,  $D_s$  仅约为  $D_v$  的 1/40, 表明 SNH 在 SC 中的扩散能力远低于在去角质皮肤 (活性表皮) 中, 说明 SC 是限制 SNH 经皮渗透的最主要因素。其原因推测是 SNH 的强亲水性使其难以扩散进入 SC 中, 从而阻碍其经皮吸收。

EP 施加方式对 SNH 经皮渗透有很大影响。药物与 EP 同时应用于皮肤时 (同时处理组), SNH 的  $t_{\text{lag}}$  较空白组显著降低, 其可在较短时间内以较高的渗透速率持续稳定穿过皮肤; 而 EP 预处理皮肤并未对 SNH 表

现出明显的促渗效果,说明在本实验条件下,EP 对皮肤渗透性的影响具有可逆性特征,其促渗作用具有时效性。在本研究中,施加电压 72 V 和施加时间 60 min 时,SNH 的渗透能力达到最大, $Q_{24h}$  和  $J$  分别为空白组的 5.4, 5.1 倍,而且实验小鼠的皮肤可以在 60 min 内恢复正常。目前的经皮给药研究和临床使用中,多为 200~500 V, 5~10 min 和 90~120 V, 30 min 的方式<sup>[10-11,19-20]</sup>,对皮肤表面施加的高电压可能会引起肌肉收缩等不良反应<sup>[7]</sup>,而本文采用低电压 EP 方式有望提高皮肤安全性,同时又具有显著的促渗作用。本文研究结果表明,采用较低电压的 EP 促进 SNH 经皮吸收具有良好的应用前景。由于小鼠皮肤与人体皮肤差异较大,为了进一步验证低电压 EP 方式对人体皮肤的安全性和有效性,后续将采用人体皮肤进行体外试验和临床研究。

**[利益冲突]** 本文不存在任何利益冲突。

#### **[参考文献]**

- [1]孙越华,朱清,李俊旭.青藤碱抗炎免疫与抗肿瘤作用研究新进展[J].中国药理学通报,2015,31(8):1040-1043.
- [2]唐琳,林也,刘乐平,等.青藤碱抗肿瘤作用与分子机制研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2021,27(4):175-185.
- [3]AMEEN D, MICHNIAK K B. Development and *in vitro* evaluation of pressure sensitive adhesive patch for the transdermal delivery of galantamine: Effect of penetration enhancers and crystallization inhibition[J]. Eur J Pharm Biopharm, 2019, 139: 262-271.
- [4]PAUDEL K S, MILEWSKI M, SWADLEY C L, et al. Challenges and opportunities in dermal/transdermal delivery[J]. Ther Deliv, 2010, 1(1): 109-131.
- [5]姜翠敏,王旋.青藤碱游离碱凝胶体外经皮渗透特性研究[J].中国药房,2008,19(30):2330-2332.
- [6]杨永钢,赵利刚,杨永铁,等.青藤碱压敏胶分散型贴剂的制备及体外经皮渗透性考察[J].沈阳药科大学学报,2009,26(1):11-14,22.
- [7]DENET A R, VANBEVER R, PRÉAT V. Skin electroporation for transdermal and topical delivery[J]. Adv Drug Deliver Rev, 2004, 56(5): 659-674.
- [8]DEMIRYUREK Y, NICKAEEN M, ZHENG M, et al. Transport, resealing, and re-poration dynamics of two-pulse electroporation-mediated molecular delivery[J]. Biochim Biophys Acta, 2015, 1848(8): 1706-1714.
- [9]李凡,郝保华,李伟泽,等.电致孔条件下巴布剂中青藤碱透皮吸收的药动学研究[J].第二军医大学学报,2008,29(9):1096-1098.
- [10]李波,胡燕,刘敏萍,等.正清风痛宁电致孔给药肾俞、邱氏穴在肾绞痛治疗中的应用[J].中国当代医药,2018,25(4):171-173,176.
- [11]王多诚,郭虹,吕健,等.探析正清风痛宁注射液电致孔技术在颈椎病康复治疗中的应用[J].世界最新医学信息文摘,2016,16(81):140,147.
- [12]VANBEVER R, PRÉAT V V. *In vivo* efficacy and safety of skin electroporation[J]. Adv Drug Deliv Rev, 1999, 35(1): 77-88.
- [13]JUNG E C, MAIBACH H I. Animal models for percutaneous absorption[J]. J Appl Toxicol, 2015, 35(1): 1-10.
- [14]江茂源,林夏,杨莎莎,等.基于溶出特性评价附子理中丸的剂型特征[J].中国实验方剂学杂志,2019,25(24):15-22.
- [15]TOJO K, CHIANG C C, CHIEN Y W. Drug permeation across the skin: effect of penetrant hydrophilicity[J]. J Pharm Sci, 1987, 76(2): 123-126.
- [16]唐斌斌.秦艽多成分在电致孔作用下的透皮研究[D].西安:西北大学,2009.
- [17]YAN H, YAN M, LI H D, et al. Pharmacokinetics and penetration into synovial fluid of systemical and electroporation administered sinomenine to rabbits[J]. Biomed Chromatogr, 2015, 29(6): 883-889.
- [18]李乐,张彩玲,宋必卫.青藤碱的药理研究与临床应用[J].中药新药与临床药理,2006,17(4):310-313.
- [19]SUNG K C, FANG J Y, WANG J J, et al. Transdermal delivery of nalbuphine and its prodrugs by electroporation[J]. Eur J Pharm Sci, 2003, 18(1): 63-70.
- [20]PETCHSANGSAI M, ROJANARATA T, OPANASOPIT P, et al. The combination of microneedles with electroporation and sonophoresis to enhance hydrophilic macromolecule skin penetration[J]. Biol Pharm Bull, 2014, 37(8): 1373-1382.

[责任编辑 刘德文]