

睾酮及其酯类醇质体凝胶剂的体内外渗透行为比较^Δ

孟舒^{1*}, 李杨², 张翀¹, 曲静², 张巍¹, 金瑛¹, 郭晶¹, 李淼¹(1.辽宁省计划生育研究院, 沈阳 110031; 2.辽宁中医药大学基础医学院, 沈阳 110032)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)22-3072-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.22.15

摘要 目的:比较睾酮、丙酸睾酮、十一酸睾酮醇质体凝胶剂的体内外渗透行为。方法:制备睾酮、丙酸睾酮、十一酸睾酮醇质体凝胶剂,采用Franz扩散池和高效液相色谱法,以累积透过量 and 渗透速率为指标,比较3种醇质体凝胶剂经小鼠皮肤的体外渗透行为;以睾酮贴剂为阳性对照,采用电化学法检测3种醇质体凝胶剂涂铺于大鼠背部0、3、6、9、12、24、36、48 h后睾酮的血药浓度, DAS 2.0软件计算药动学参数。结果:睾酮、丙酸睾酮、十一酸睾酮醇质体凝胶剂24 h的累积渗透量分别为(234.31±13.8)、(175.63±41.1)、(72.60±15.3) μg/cm², 渗透速率分别为(10.25±1.9)、(7.64±1.4)、(2.96±0.8) μg/(cm²·h);上述3种醇质体凝胶剂和阳性对照的药动学参数依次为 c_{max} (20.19±2.57)、(17.50±2.91)、(0.23±0.04)、(14.97±2.12) ng/ml, $t_{1/2Ka}$ (2.80±0.45)、(3.36±0.59)、(4.02±0.62)、(4.20±0.71) h, AUC_{0-48h} (13.85±1.96)、(13.93±2.13)、(0.35±0.07)、(11.76±2.31) ng·h/ml。结论:睾酮和丙酸睾酮醇质体凝胶剂具有较好的体内外渗透行为。

关键词 睾酮;丙酸睾酮;十一酸睾酮;醇质体凝胶剂;药动学;体外渗透

Comparison of *in vivo* and *in vitro* Permeation Behaviors of the Ethosome Gels of Testosterone and Its Esters

MENG Shu¹, LI Yang², ZHANG Cong¹, QU Jing², ZHANG Wei¹, JIN Ying¹, GUO Jing¹, LI Miao¹(1.Liaoning Research Institute of Family Planning, Shenyang 110031, China; 2.School of Basic Medical Sciences, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110032, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To compare *in vivo* and *in vitro* permeation behaviors of the ethosome gels of testosterone, testosterone propionate and testosterone undecanoate. METHODS: The ethosome gels of testosterone, testosterone propionate and testosterone undecanoate were prepared. With cumulative permeating amount and permeation rate as the indexes, Franz diffusion cell and HPLC were employed to compare *in vitro* permeation behaviors of 3 kinds of ethosome gels in mouse skin. With testosterone patch as the positive control drug, electrochemistry method was adopted to detect the concentration of testosterone in plasma 0, 3, 6, 9, 12, 24, 36 and 48 h after applying such 3 kinds of ethosome gels on the back of rats, and then pharmacokinetic parameters were calculated with DAS 2.0 software. RESULTS: 24 h cumulative permeating amounts of the ethosome gels of testosterone, testosterone propionate and testosterone undecanoate were (234.31±13.8), (175.63±41.1) and (72.60±15.3) μg/cm², and the permeation rates were (10.25±1.9), (7.64±1.4) and (2.96±0.8) μg/(cm²·h), respectively. The pharmacokinetic parameters of the above-mentioned three kinds of ethosome gels and the positive control drug were respectively as follows as c_{max} of (20.19±2.57), (17.50±2.91), (0.23±0.04), (14.97±2.12) ng/ml, $t_{1/2Ka}$ of (2.80±0.45), (3.36±0.59), (4.02±0.62), (4.20±0.71) h, AUC_{0-48h} of (13.85±1.96), (13.93±2.13), (0.35±0.07), (11.76±2.31) ng·h/ml. CONCLUSIONS: *in vivo* and *in vitro* permeation behaviors of the ethosome gels of testosterone and testosterone propionate are fairly good.

KEYWORDS Testosterone; Testosterone propionate; Testosterone undecanoate; Ethosome gel; Pharmacokinetics; *in vitro* permeation

目前我国已跨入了老龄社会,随着年龄增长,男性体内睾酮水平显著降低,因此给予外源性睾酮以补充自身分泌不足是非常必要的^[1]。目前最普遍使用的外源性雄激素是睾酮(T)、丙酸睾酮(TP)和十一酸睾酮(TU)。近年来,经皮给药制剂已成为第三代给药系统开发研究的中心内容之一,但由于皮肤的致密角质层结构、药物本身理化性质以及高分子材料的局限性等原因影响了部分药物的透皮吸收,阻碍了这类药物透皮给药制剂的开发与应用^[2]。醇质体是近年来药物传递系统中一种具有高变形性、高包封率、能完整透过皮肤的新型

脂质体^[3-5]。因此本实验探索将T、TP、TU制成醇质体凝胶剂,研究这3种制剂的体外经皮渗透特性及其体内药动学特征,旨在为T及其酯类的临床应用寻求一种更为合理、安全、有效的药物剂型。

1 材料

1.1 仪器

Waters 600-2487型高效液相色谱仪(美国Waters公司); 3-30K型高速离心机(德国Sigma公司,离心半径:6.5 cm,下同);Bio-20型紫外分光光度计(美国PE公司);Cobas-e411型电化学发光仪(德国Roche公司);TK-20B型透皮扩散试验仪(上海瑞凯科技贸易有限公司);SNB-1型数字黏度仪(上海方瑞仪器有限公司);ZetaPALS型激光散射粒径测定仪(美国

^Δ 基金项目:辽宁省科学事业公益研究基金

* 研究员。研究方向:药物缓控释制剂。电话:024-86116223。

E-mail: mengshu888@sina.com

Brookhaven公司)。

1.2 药品与试剂

T、TP、TU 对照品(中国食品药品检定研究院,批号:0079-9706、0008-9404、0242-9501,纯度:>98%);T、TP、TU 原料药(武汉远城共创科技有限公司,批号:120312、120917、110809,纯度:>98%);T 试剂盒(德国 Roche 公司,批号:174548-03);T 贴剂(北京紫竹药业有限公司,批号:20100198,规格:每贴 16.3 mg);注射用大豆磷脂(PC,德国 Lipoid 公司);乙腈、异丙醇为色谱纯,水为重蒸水,其他试剂均为分析纯。

1.3 动物

BALB/c 小鼠,体质量 18~22 g;成年 SD 大鼠,体质量 250~300 g,♂,由辽宁长生生物技术有限公司提供,合格证号:SCXK(辽)2010-0001。

2 方法与结果

2.1 醇质体的制备及其特性研究

采用乙醇注入法制备醇质体^[6]。将药物(T、TP、TU 原料药)、肉豆蔻酸异丙酯(IPM)或聚氧乙烯蓖麻油(EL-35)和 PC 溶解在无水乙醇中,于充满 N₂ 的密闭容器中 40 °C 保温搅拌,使其完全溶解,作为乙醇相。将十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)溶解在去离子水中作为水相,用注射器以溪流状缓慢将水相加入到乙醇相中,在 40 °C、700 r/min 搅拌 10 min。待样品冷却到室温后,经 0.45 μm 微孔滤膜过滤。取醇质体适量加 40% 乙醇稀释,用激光散射粒径仪测定醇质体的平均粒径及 ζ 电位。另分别取 T 醇质体、TP 醇质体以及 TU 醇质体各 1 ml,采用透析法测定药物的包封率^[7-8]。不同药物醇质体的粒径、ζ 电位、包封率测定结果见表 1。

表 1 3 种醇质体的粒径、ζ 电位、包封率测定结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 1 Determination results of particle size, ζ potential and encapsulation efficiency of 3 kinds of ethosome ($\bar{x} \pm s, n=3$)

制剂	质量浓度,mg/ml	粒径,nm	ζ 电位,mV	包封率,%
T 醇质体	7.5	167.3±9.8	13.52±3.9	90.7±2.7
TP 醇质体	7.5	156.5±3.5	13.81±2.8	91.4±2.9
TU 醇质体	7.5	120.5±7.5	16.84±3.6	93.6±2.2

由表 1 可知,T 醇质体、TP 醇质体、TU 醇质体的粒径均小于 200 nm,ζ 电位均大于 10 mV,包封率均大于 90%。

2.2 3 种醇质体凝胶剂的制备^[9]

称取卡波姆 941NF 适量,分散在水中搅拌,室温放置溶胀得 2% (m/m) 空白基质;精密称取 5 g 药物醇质体(T 醇质体、TP 醇质体、TU 醇质体),缓慢加入到 5 g 空白基质中混合均匀后,加入 1.5% 三乙醇胺调节 pH,充分搅拌后即成醇质体凝胶。样品呈乳白色胶体,均匀细腻,涂展性好。取样品 1 g 加蒸馏水 10 ml 稀释,搅拌均匀后测定其 pH;采用黏度仪选择 28 号转子,5 r/min 下测定其在 25 °C 的黏度,结果见表 2。

表 2 3 种醇质体凝胶剂的 pH、黏度和含量测定结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 2 pH, viscosity and content determination results of 3 kinds of ethosome gels ($\bar{x} \pm s, n=3$)

制剂	pH	黏度,cP	含量,mg/g
T 醇质体凝胶剂	6.12±0.05	5 210±13.25	3.62±0.08
TP 醇质体凝胶剂	6.05±0.07	5 319±14.84	3.72±0.05
TU 醇质体凝胶剂	6.07±0.05	5 504±18.91	3.65±0.07

2.3 凝胶剂的含量测定

色谱柱:Kromasil C₁₈(150 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:T 测定采用甲醇-四氢呋喃-水(27:15:58),TP 测定采用甲醇-四

氢呋喃-水(53:15:32),TU 测定采用乙腈-异丙醇-水(43:43:14);流速:1.0 ml/min;柱温:35 °C;检测波长:240 nm;进样量:10 μl。T、TP、TU 对照品溶液和 T 醇质体凝胶剂、TP 醇质体凝胶剂、TU 醇质体凝胶剂的色谱图见图 1。

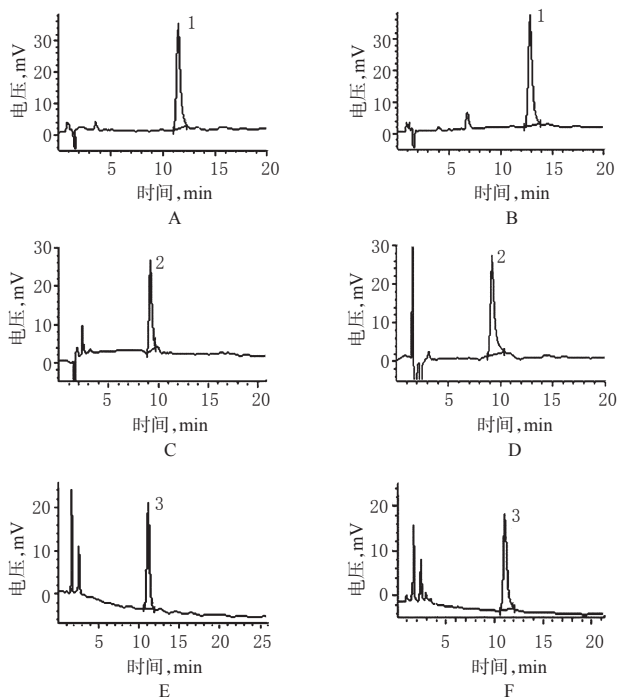


图 1 高效液相色谱图

A.T 对照品;B.T 醇质体凝胶剂;C.TP 对照品;D.TP 醇质体凝胶剂;E.TU 对照品;F.TU 醇质体凝胶剂;1.T;2.TP;3.TU

Fig 1 HPLC chromatographs

A. testosterone reference substance; B. testosterone ethosome gel; C. testosterone propionate reference substance; D. testosterone propionate ethosome gel; E. testosterone undecanoate reference substance; F. testosterone undecanoate ethosome gel; 1. testosterone; 2. testosterone propionate; 3. testosterone undecanoate

该色谱条件下,T 醇质体凝胶剂、TP 醇质体凝胶剂、TU 醇质体凝胶剂的方法回收率分别为 98.5%、99.3%、98.7% (n=6),日内 RSD 分别为 0.8%、1.2%、1.1% (n=5)。日间 RSD 分别为 2.1%、1.5%、1.7% (n=5)。3 种醇质体凝胶剂的含量测定结果见表 2。

2.4 3 种醇质体凝胶剂的体外透皮试验

取 BALB/c 小鼠,处死后剪净腹部的毛,用生理盐水洗净小鼠腹部皮肤,剥离腹部皮肤,分离皮下组织以及脂肪。将处理好的离体鼠皮置于 Franz 扩散池上,使皮肤的角质层朝向释放池,释放池分别放入 T 醇质体凝胶剂、TP 醇质体凝胶剂、TU 醇质体凝胶剂各 1 g,接收池内注满 3% EL-35 水作为接收液,并在池中加入搅拌子,将整套扩散池装置放在恒温磁力搅拌器上,搅拌速度 150 r/min,温度保持在 32 °C。分别在 2、4、6、8、10、16、18、20、22、24 h 取样 10 ml,同时用新鲜的 3% EL-35 水补足。整个实验过程中,保持小鼠离体皮肤表面与接收液完全接触,不能有气泡。样品经 0.45 μm 滤膜过滤,进样检测,计算累积渗透量和渗透速率,经 Higuchi 方程回归计算相关系数 r。3 种醇质体凝胶剂的体外渗透曲线见图 2,体外渗透结果见表 3。

2.5 3 种醇质体凝胶剂在大鼠体内的药动学研究

将大鼠麻醉手术去除外生殖器后饲养 10 d,采血测定 T 含

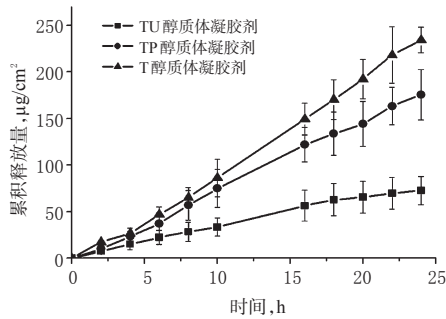


图2 3种醇质体凝胶剂的体外渗透曲线($n=3$)

Fig 2 *in vitro* permeation curves of 3 kinds of ethosome gels ($n=3$)

表3 3种醇质体凝胶剂的体外渗透情况($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 3 *in vitro* permeation of 3 kinds of ethosome gels ($\bar{x} \pm s, n=3$)

样品	累积渗透量, $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	渗透速率, $\mu\text{g}/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})$	r
T醇质体凝胶剂	234.31 ± 13.8	10.25 ± 1.9	0.981
TP醇质体凝胶剂	175.63 ± 41.1	7.64 ± 1.4	0.992
TU醇质体凝胶剂	72.60 ± 15.3	2.96 ± 0.8	0.995

量,将合格(T含量低于0.2 ng/ml)的实验大鼠随机分成4组,分别为T醇质体凝胶剂组、TP醇质体凝胶剂组、TU醇质体凝胶剂组和T贴剂组,每组5只。给药前受试大鼠禁食过夜,于次日将相应药物按6 mg/kg剂量放入封闭性斑贴试验系统(Hill top chambers)中,涂铺于大鼠背部并用绷带固定,并于给药后0、3、6、9、12、24、36、48 h由眼眶静脉采血0.5 ml,4 °C、4 000 r/min离心5 min,吸出血清置于-20 °C冰箱保存。采用电化学自动分析仪和配套的T试剂盒检测血清中T含量。将测得的血药浓度数据经DAS2.0药动学软件进行参数模型拟合。4种样品在大鼠体内的药-时曲线见图3,药动学参数见表4。

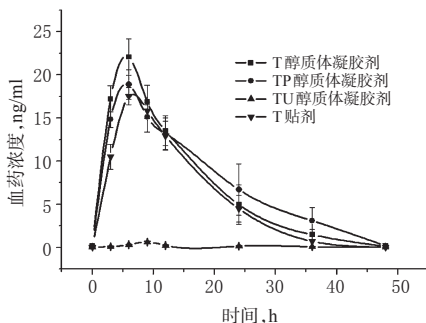


图3 4种样品在大鼠体内的药-时曲线($n=5$)

Fig 3 Drug-time curves of 4 kinds of samples in rats ($n=5$)

由图3可知,TU醇质体凝胶剂中T的血药浓度非常低,说明由于药物的分子质量大,很难透过皮肤屏障扩散入血;T醇质体凝胶剂和TP醇质体凝胶剂在给药后的12 h内能维持较高的血药浓度,24 h血药浓度明显降低,且均在6 h左右达峰值。采用DAS2.0药动学软件拟合,3种醇质体凝胶剂体内过程均符合一级吸收-室模型,权重系数为1/C。由表4可知,T醇质体凝胶剂组和TP醇质体凝胶剂组大鼠的 c_{max} 和 $\text{AUC}_{0-48\text{h}}$ 均高于T贴剂组,表明T醇质体凝胶剂和TP醇质体凝胶剂的吸收速度比T贴剂的吸收速度快,进入体内的药量要高于T贴剂组。TP醇质体凝胶剂组的 $t_{1/2(\text{ke})}$ 略高于T醇质体凝胶剂组和T贴剂组,表明TP醇质体凝胶剂可以有效延长作用时间。综上所述,T醇质体凝胶剂和TP醇质体凝胶剂能有效包裹药物透

过皮肤,形成药物贮库而持久发挥药效^[4]。

表4 4种样品在大鼠体内的药动学参数($\bar{x} \pm s, n=5$)

Tab 4 Pharmacokinetic parameters of 4 kinds of samples in rats ($\bar{x} \pm s, n=5$)

参数	T醇质体凝胶	TP醇质体凝胶	TU醇质体凝胶	T贴剂
$A, \text{ng}/\text{ml}$	77.17 ± 37.53	72.55 ± 32.16	0.53 ± 0.11	158 ± 50.79
K_e, h^{-1}	0.12 ± 0.02	0.11 ± 0.02	0.046 ± 0.01	0.127 ± 0.02
K_a, h^{-1}	0.24 ± 0.06	0.21 ± 0.07	0.17 ± 0.03	0.165 ± 0.02
$t_{1/2(\text{ka})}, \text{h}$	2.80 ± 0.45	3.36 ± 0.59	4.02 ± 0.62	4.2 ± 0.71
$t_{1/2(\text{ke})}, \text{h}$	5.78 ± 0.71	6.56 ± 0.82	14.98 ± 2.61	5.43 ± 0.87
t_{max}, h	5.67 ± 0.49	6.65 ± 0.74	10.43 ± 1.78	6.87 ± 0.91
$c_{\text{max}}, \text{ng}/\text{ml}$	20.19 ± 2.57	17.50 ± 2.91	0.23 ± 0.04	14.97 ± 2.12
$\text{AUC}, \text{ng} \cdot \text{h}/\text{ml}$	13.85 ± 1.96	13.93 ± 2.13	0.35 ± 0.07	11.76 ± 2.31
$\text{CL}/F(s), \text{ml} \cdot \text{kg}/\text{h}$	0.432 ± 0.06	0.432 ± 0.06	17.28 ± 2.51	0.504 ± 0.09
$V/F(c), \text{ml}/\text{kg}$	0.15 ± 0.02	0.17 ± 0.03	15.54 ± 2.13	0.167 ± 0.03

3 讨论

醇质体由于在制备过程由较高浓度的乙醇代替了胆固醇,相对于脂质体的刚性,醇质体柔韧性增加,可以变形,并载药透过皮肤角质层细胞间隙,增加药物的透皮吸收;同时乙醇本身就是透皮吸收促进剂,能与角质层的脂质相互作用,降低相变温度,增加其流动性,促进药物的渗透^[9-10]。

TP、TU为T的侧链上加入丙酸酯、十一酸酯,因此在血中的半衰期增加。TU由于侧链较长,脂溶性增加,虽然容易制成稳定的醇质体凝胶剂,但仍然很难透过皮肤,不宜制成透皮制剂。TP侧链较短,实验结果表明,TP醇质体凝胶剂能够有效提高T的血药浓度,使之维持正常的生理水平。由于TP和TU进入体内后绝大部分水解成为T发挥作用,因此在药动学实验中以T的血药浓度为研究指标。本研究结果表明,T和TP的醇质体凝胶剂有望成为一种更为安全、有效的T替代制剂。

参考文献

- [1] Snabes MC, Simes SM. Approved hormonal treatments for HSDD: an unmet medical need[J]. *J Sex Med*, 2009, 6(7): 1846.
- [2] 朱克旭,刘新兰.国内外经皮吸收制剂的研究进展[J]. *中国药事*, 2013, 27(2): 205.
- [3] Anitha P, Ramkanth S, Uma Sankari K, et al. Ethosomes-A noninvasive vesicular carrier for transdermal drug delivery[J]. *Int J Rev Life Sci*, 2011, 1(1): 17.
- [4] 安珂瑶,孙勇.醇质体的研究进展[J]. *中国药房*, 2011, 22(5): 463.
- [5] 林碧雯,王文娟,王洪权,等.新型药物载体:醇质体的特点及研究进展[J]. *中国药物应用与监测*, 2014, 11(2): 121.
- [6] Meng S, Chen Z, Yang L, et al. Enhanced transdermal bioavailability of testosterone propionate via surfactant-modified ethosomes[J]. *Int J Nanomed*, 2013, doi: 10.2147/IJN.S46748.
- [7] 陈卫军,袁勇,王鲁妹,等.异甘草素固体脂质纳米粒包封率测定方法的研究[J]. *中国药房*, 2011, 22(21): 1994.
- [8] 孟舒,杨立群,马丽颖,等.十一酸睾酮醇质体制备及其体外经皮渗透研究[J]. *中国中药杂志*, 2013, 38(9): 1371.
- [9] 杨飞,李芳,焦海胜,等.秋水仙碱醇质体凝胶的制备及质量控制[J]. *中国药房*, 2009, 20(1): 50.
- [10] 李理宇,王洪权.新型经皮给药载体:醇质体的研究进展[J]. *中国新药杂志*, 2010, 19(1): 33.

(收稿日期:2014-09-24 修回日期:2015-01-27)

(编辑:邹丽娟)