

# 两种卡泊三醇软膏的体外经皮吸收比较

黎超<sup>1\*</sup>, 孟宪勇<sup>2</sup>(1. 武汉疗养院温泉康复疗养区药剂科, 湖北咸宁 437100; 2. 武汉疗养院东湖疗养区, 武汉 430072)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)25-2335-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.25.11

**摘要** 目的: 比较两种不同厂家生产的卡泊三醇软膏(样品A和样品B)的体外透皮吸收情况, 并与卡泊三醇搽剂进行比较。方法: 采用改良Franz扩散池, 小型猪离体皮片分别涂样品A、B和卡泊三醇搽剂(以主药计均为5 μg), 于给药后2、4、6、8、10、12 h吸取接收液, 药物接触的皮片用稀释剂提取。采用高效液相色谱法测定接收液和提取液中卡泊三醇的含量, 计算卡泊三醇的皮片保留量、透过百分率和吸收百分率。结果: 样品A、B和卡泊三醇搽剂中卡泊三醇在皮片内的保留量分别为(1 519.07 ± 655.88)、(605.83 ± 235.33)、(2 897.29 ± 723.89) ng/g; 吸收百分率平均值分别为3.21%、1.25%、6.69%, 三者比较差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ); 透过百分率均低于0.36%。结论: 样品A、B的经皮行为具有明显差异, 其中样品A的生物利用度较好。

**关键词** 卡泊三醇; 经皮吸收; 离体实验; HPLC; 软膏; 搽剂

## Comparison of Transdermal Absorption of 2 Kinds of Calcipotriol Ointment *in vitro*

LI Chao<sup>1</sup>, MENG Xian-yong<sup>2</sup>(1. Dept. of Pharmacy, Wuhan Sanatorium Thermal Spring Convalescence Branch, Hubei Xianning 437100, China; 2. Wuhan Sanatorium Donghu Branch, Wuhan 430072, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To compare the transdermal absorption *in vitro* of 2 kinds of Calcipotriol ointment (sample A and B) from different manufacturers, and compare with Calcipotriol liniment. METHODS: Using modified Franz diffusion cell method, isolated skin of miniature pig was treated with sample A, sample B or Calcipotriol liniment (all 5 μg by main components), and then absorbed receptor fluid 2, 4, 6, 8, 10, 12 hours after administration; the treated skin was extracted with diluents. HPLC method was adopted to determine the content of calcipotriol in receptor liquid and extract solution. The retention volume, permeation percentage and absorption percentage of calcipotriol were all calculated. RESULTS: The retention volume of calcipotriol from sample A and B and Calcipotriol liniment in skin were (1 519.07 ± 655.88) ng/g, (605.83 ± 235.33) ng/g and (2 897.29 ± 723.89) ng/g, respectively. The average absorption percentages were 3.21%, 1.25% and 6.69%, respectively; there was statistical significance ( $P < 0.05$ ). The permeation percentages were all lower than 0.36%. CONCLUSIONS: The transdermal potential of sample A and B have significant difference, and sample A is good in bioavailability.

**KEYWORDS** Calcipotriol; Transdermal absorption; Experiment *in vitro*; HPLC; Ointment; Liniment

银屑病是一种慢性复发性疾病, 临床上分为寻常型、脓疱型、关节型和红皮型4种类型, 其中寻常型占99%以上。斑块状银屑病是寻常型银屑病中最为常见的一种皮损类型<sup>[1-2]</sup>。卡泊三醇能显著抑制表皮角质形成细胞的增殖诱导分化, 促进角质形成细胞的凋亡, 最终促使炎症反应性斑块消退, 其药理作用与其广泛的抗炎性反应介质及细胞因子作用有关<sup>[3]</sup>。体外研究中发现, 卡泊三醇显示出与骨化三醇相似的细胞增殖和分化作用, 并具有一定的抗炎、免疫调节作用, 且对体内钙代谢的影响远低于骨化三醇<sup>[4]</sup>, 不失为银屑病外用制剂的首选药物之一。皮肤外用制剂的基质会影响药物的透皮能力, 从而改变药物在皮层的滞留量, 同时进入系统的药物也可能会受影响。本研究通过体外透皮试验比较了不同厂家的卡泊三醇制剂的透皮吸收情况, 对其临床使用的安全性进行评价, 并为进一步优化处方提供依据。

\* 主治医师, 硕士。研究方向: 临床药学。E-mail: 254051743@qq.com

## 1 材料

### 1.1 仪器

TP-5型智能透皮仪(南京红蓝电子科技中心); DZKW-4型电子恒温水浴锅(北京中兴伟业仪器有限公司); 高效液相色谱(HPLC)仪(日本岛津公司)。

### 1.2 药品与试剂

卡泊三醇软膏(样品A, 重庆华邦制药有限公司, 批号: 2013001; 样品B, 爱尔兰利奥制药有限公司, 批号: EH0436; 规格均为: 15 g: 0.75 mg); 卡泊三醇搽剂(爱尔兰利奥制药有限公司, 批号: DG7546, 规格: 30 ml: 1.50 mg); 卡泊三醇对照品(重庆华邦制药有限公司, 批号: Cal-201212003, 纯度: 99.9%); 甲醇为色谱纯, 其余试剂均为分析纯, 水为超纯水。

### 1.3 动物

普通小型猪3只, ♂, 体质量9~10 kg, 由解放军第三军医大学实验动物中心提供, 合格证号: SCXK(军)2012-0003。

## 2 方法与结果

## 2.1 含量测定

2.1.1 色谱条件与系统适应性试验。色谱柱: Shimadzu Shim-pack VP-ODS C<sub>18</sub> (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-水 (40:60), 流速: 0.8 ml/min; 检测波长: 260 nm; 柱温: 30 °C; 进样量: 100 μl。取卡泊三醇对照品溶液、样品A和样品B给药12 h的接收液、卡泊三醇搽剂接收液和样品A、样品B、卡泊三醇搽剂第一次的提取液, 进样测定, 记录色谱, 色谱图见图1。

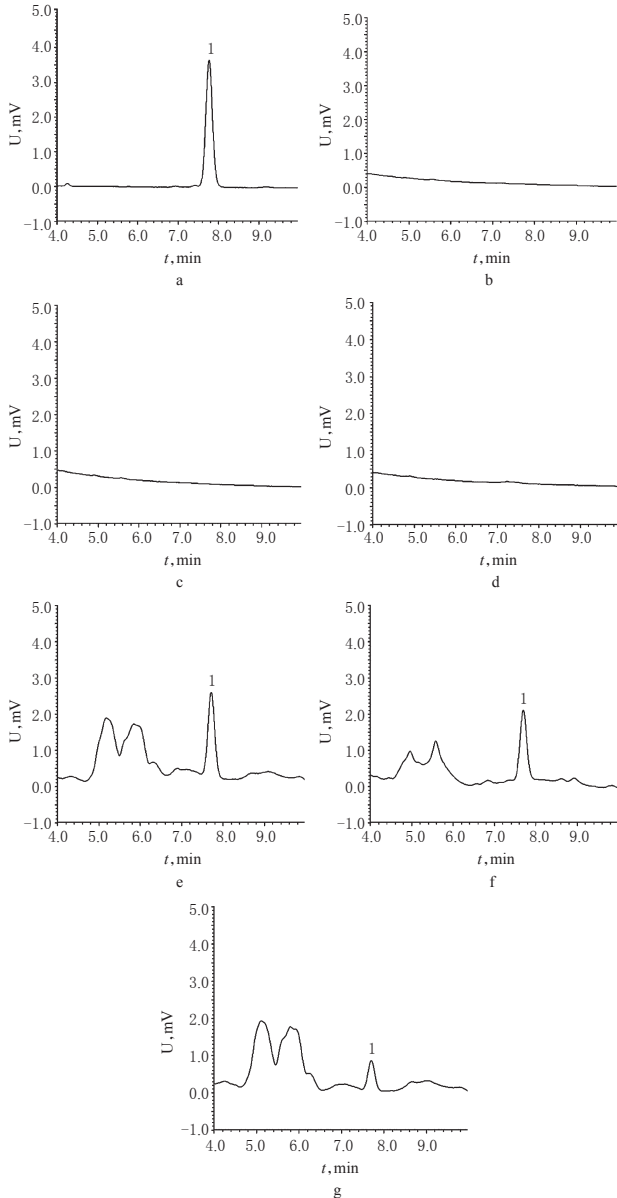


图1 高效液相色谱图

a. 卡泊三醇对照品溶液; b. 样品A接收液; c. 样品B接收液; d. 卡泊三醇搽剂接收液; e. 卡泊三醇搽剂提取液; f. 样品A提取液; g. 样品B提取液; 1. 卡泊三醇

Fig 1 HPLC chromatograms

a. calcipotriol control; b. receptor solution of sample A; c. receptor solution of sample B; d. receptor solution of calcipotriol liniment; e. extraction solution of calcipotriol liniment; f. extraction solution of sample A; g. extraction solution of sample B; 1. calcipotriol

2.1.2 标准曲线的绘制。精密称取卡泊三醇对照品10.71 mg, 置于100 ml棕色量瓶中, 加入甲醇约80 ml, 超声溶解后, 加甲

醇定容至刻度; 再精密量取5.0 ml, 加甲醇稀释至250 ml制成质量浓度为2 139.86 ng/ml的标准贮备液。精密量取标准贮备液5.0 ml, 加稀释剂[甲醇-0.01 mol/L磷酸氢二胺(70:30)]稀释至100 ml, 制成106.99 ng/ml的溶液, 再加稀释剂稀释制成质量浓度分别为85.59、64.20、42.80、32.10、21.40、10.70、5.35 ng/ml的标准溶液, 进样测定, 记录色谱。以峰面积(y)对质量浓度(x)进行线性回归, 得回归方程为:  $y=225.50x+138.03$  ( $r=0.9999$ ,  $n=8$ )。结果表明, 卡泊三醇检测质量浓度的线性范围为5.35~106.99 ng/ml。以主药加入量为5 μg、提取溶剂用量5 ml计, 对应的小猪皮片中卡泊三醇的保留百分率线性范围为0.5%~10%。

2.1.3 检测限与定量限测定。精密量取标准贮备液适量, 加等渗磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.4)定量稀释制成一定浓度的溶液, 进样测定。当信噪比在 $10 \pm 1$ 范围内, 得定量限为3.57 ng/ml; 当信噪比在 $3 \pm 1$ 范围内, 得检测限为1.07 ng/ml。

2.1.4 回收率与精密性试验。精密量取标准贮备液适量, 加稀释剂定量稀释制成质量浓度分别为85.59、42.80、10.70 ng/ml的溶液, 各5份, 进样测定, 记录色谱。以测得值与加入值的比值计算方法回收率, 并同日内测定5次考察日内精密性, 连续测定5 d考察日间精密性, 结果见表1。

表1 精密性与方法回收率试验结果( $n=5$ )

Tab 1 Results of precision and recovery tests ( $n=5$ )

质量浓度, ng/ml	方法回收率, %	RSD, %	
		日内	日间
10.70	97.01 ± 3.08	2.76	3.17
42.80	98.48 ± 2.22	1.88	3.08
85.59	99.04 ± 3.09	2.54	2.55

2.1.5 提取回收率。取未使用的小猪皮片, 浸泡于等渗PBS中12 h, 用透明胶带黏取皮肤表面, 直至角质层完全消失, 用滤纸吸干水分后剪碎待用。精密量取标准贮备液5.0 ml, 加稀释剂稀释制成质量浓度分别为0.70、42.80、85.59 ng/ml的溶液, 各5份, 再分别加入皮片约1.0 g, 浸泡6 h, 超声15 min, 离心, 取上清液和沉淀, 分别测定其中卡泊三醇的浓度, 将上清液和沉淀中的测定结果相加计算提取回收率。结果提取回收率分别为80.8%、83.5%、85.4%, RSD分别为5.4%、4.6%、3.3% ( $n=5$ )。

## 2.2 体外透皮试验<sup>[5-10]</sup>

2.2.1 试验方法。试验共进行3个周期, 每个周期使用1头小猪, 小猪处死后, 取肋腹部皮肤, 将皮片绷于接收池上, 角质层朝上, 将玻璃供给室置于皮肤上, 与玻璃接收室的瓶口对齐, 供给室与接收室两部分用不锈钢磨口夹固定, 置于透皮扩散仪上, 启动水浴加热, 水浴温度( $37.0 \pm 0.1$ ) °C。接收室内加入17 ml等渗PBS作为接收液, 使皮肤与接收液预平衡30 min。然后称取样品A、样品B和卡泊三醇搽剂, 每份各0.1 g(含卡泊三醇5 μg), 分别称取2份, 均匀涂抹于供给室内小猪皮片的角质面, 使受试物与皮面完全接触, 皮片涂药面积为1.5 cm<sup>2</sup>。启动磁力搅拌, 转速为400 r/min。给药后不封包, 实验室除一盏黄色光源用以操作照明外, 其余均保持暗室环境(模拟临床用药方式)。

2.2.2 采样与处理。于给药后12 h取接收液1 ml, 测定其中卡泊三醇的浓度。取下扩散池的皮片, 用等渗PBS擦拭表皮, 用

透明胶带黏取皮肤表面,直至角质层完全消失,沿圆形的给药部位剪取皮片,用滤纸吸干水分后称质量,然后剪碎,浸泡于5 ml的稀释剂中6 h,超声15 min,离心,取上清测定其中卡泊三醇的浓度。弃上清,取沉淀加入3 ml稀释剂浸泡6 h,超声15 min,萃取、离心,取上清,测定其中卡泊三醇的浓度。

2.2.3 评价指标。(1)按公式计算皮片保留量 $Q_s$ : $Q_s=c_s \times V_s$ 。式中, $c_s$ 为萃取皮片受试物浓度, $V_s$ 为萃取皮片受试物所用稀释剂体积。(2)按公式计算透过百分率 $P_p$ : $P_p=Q/M \times 100\%$ ,式中, $Q$ 为累积渗透量, $M$ 为给药量。(3)按公式计算吸收百分率 $P_a$ : $P_a=(Q+Q_s)/M \times 100\%$ 。

2.2.4 数据处理。采用SPSS16.0软件分析,所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用单因素方差进行组间差异显著性检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2.2.5 结果。皮片内卡泊三醇的保留量结果见表2;卡泊三醇的透过百分率和吸收百分率结果见表3。

表2 皮片内卡泊三醇的保留量( $n=6$ )

周期	保留量,ng/g		
	样品A	样品B	卡泊三醇搽剂
第一	2 597.81	578.84	2 906.25
	1 338.97	864.66	3 155.03
第二	613.97	232.58	1 627.96
	1 768.90	556.45	2 746.88
第三	1 249.85	858.09	3 116.75
	1 544.93	544.37	3 830.89
$\bar{x} \pm s$	1 519.07 $\pm$ 655.88	605.83 $\pm$ 235.33*	2 897.29 $\pm$ 723.89*

与样品A比较: \* $P < 0.05$

vs. sample A: \* $P < 0.05$

表3 卡泊三醇的透过百分率和吸收百分率结果( $n=6$ )

Tab 3 Permeation percentage and absorption percentage of calcipotriol( $n=6$ )

周期	样品A		样品B		卡泊三醇搽剂	
	透过百分率,%	吸收百分率,%	透过百分率,%	吸收百分率,%	透过百分率,%	吸收百分率,%
第一	<0.36	4.92	<0.36	1.26	<0.36	6.84
	<0.36	2.87	<0.36	2.14	<0.36	7.49
第二	<0.36	1.65	<0.36	0.59	<0.36	4.68
	<0.36	3.70	<0.36	0.99	<0.36	7.27
第三	<0.36	3.16	<0.36	1.61	<0.36	7.49
	<0.36	2.96	<0.36	0.91	<0.36	6.34
$\bar{x} \pm s$	<0.36	3.21 $\pm$ 1.07	<0.36	1.25 $\pm$ 0.56*	<0.36	6.69 $\pm$ 1.08*

与样品A比较: \* $P < 0.05$

vs. sample A: \* $P < 0.05$

由表2和表3结果可知,样品A的皮片保留量和透过百分率均比样品B高,比卡泊三醇搽剂低,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。

### 3 讨论

由图1显示,样品A、样品B和卡泊三醇搽剂的接收液中均没有卡泊三醇的色谱峰,结果其含量均在检测限以下,表明3种透皮给药制剂经皮肤给药后均仅微量进入血液,故其在临床使用中均是安全的。卡泊三醇搽剂的皮片内保留量和吸收百分率明显高于样品A( $P < 0.05$ ),这是因为搽剂为液体制剂,其基质多为乙醇、油或溶液等,而软膏为半固体制剂,其基质多为凡士林、羊毛脂等油脂类物质。样品A的皮片内保留量和吸收百分率均明显高于样品B( $P < 0.05$ ),推测样品A在皮层内的生物利用度高于样品B。这种差异可能是由不同的制剂处方组成所致。总之,用药后样品A的皮肤保留量正好介于卡泊三醇搽剂和样品B之间,样品B及搽剂均为已上市应用多年的制剂,因此推测样品A的临床应用是安全有效的。

### 参考文献

- [1] 张学军.皮肤性病学[M].5版.北京:人民卫生出版社,2001:117-122.
- [2] 满孝勇,郑敏.银屑病的治疗[J].中华皮肤科杂志,2006,39(3):174.
- [3] 李会绒.卡泊三醇软膏治疗寻常型银屑病100例疗效观察[J].吉林医学,2012,33(9):1885.
- [4] Murdoch D, Clissold SP. Calcipotriol: a review of its pharmacological properties and therapeutic use in psoriasis vulgaris[J]. *Drugs*, 1992, 43(3):415.
- [5] Avikam Harel, Zeev Even-Chen. *Compositions and methods for treating hyperproliferative epidermal diseases*, WO:2006120682 A2[P].2006-11-16.
- [6] Skelly JP, Yacobi A, Shah VP, et al. FDA and AAPS report of the workshop on principles and practices of in vitro percutaneous penetration studies: relevance to bioavailability and bioequivalence[J]. *Pharmaceutical Research*, 1987, 4(3):265.
- [7] OECD. *Guideline for the testing of chemicals 428-skin absorption: in vitro method*[S].2004-04-13.
- [8] OECD. *Guidance document for the conduct of skin absorption studies-oecd series on testing and assessment, Number 28*[S].2004-05-05.
- [9] 胡晋红.皮肤药理学[M].北京:化学工业出版社,2008:158-189.
- [10] 祝伟伟,翟光喜,于爱华,等.喷昔洛韦微乳经皮渗透的研究[J].山东大学学报:医学版,2008,46(3):320.

(收稿日期:2013-12-31 修回日期:2014-04-18)

《中国药房》杂志——《中国科学引文数据库》(CSCD)来源期刊,欢迎投稿、订阅