

低频复合脉冲电流对蟾酥经皮吸收的动态影响^{*}

苏永华[△] 牛欣 杨学智 张胜 程薇 席时芳

摘要 目的 考察蟾酥的经皮吸收规律以及低频复合脉冲电流对蟾酥经皮吸收的影响。方法 采用水平式三室离体经皮流通扩散池,用高效液相色谱仪测定蟾酥中蟾毒灵、华蟾酥毒基及脂蟾毒配基等成分的经皮吸收量并计算经皮吸收速率。结果 蟾酥中主要成分可经皮吸收,但皮肤透过量较少,外加低频复合脉冲电流可明显提高蟾酥主要成分经皮吸收的累积渗透量和经皮扩散速率,2h 后出现差异,4h 后差异显著。13.8Hz 促进蟾酥经皮吸收的效果较好。结论 蟾酥的主要成分可以通过皮肤给药被吸收,低频复合脉冲电流可显著提高蟾酥的经皮吸收量和经皮吸收速率。

关键词 经皮吸收 离子导入 低频复合脉冲电流 蟾酥

Dynamic Effect of Low Frequency Complex Impulse Current on Transdermal Absorption of Secretio Bufonis
SU Yong-hua, NIU Xin, YANG Xue-zhi, et al *Beijing University of Chinese Medicine, Beijing (100029)*

Objective :To explore the regulation of transdermal absorption of Secretio Bufonis (SB) and the effect of low frequency complex impulse current (LFCIC) on it. **Methods** :By modifying three-chamber flow diffusion pool to develop a prototype LFCIC device for transdermal delivery, using high performance liquid chromatograph (HPLC) to determine the quantitative transdermal absorption of the amount of ingredients of SB, including bufalin, cinobufagin and resibufo-genin, etc. and the transdermal absorption velocity was calculated. **Results** :The chief ingredients of SB could be absorbed through skin, but the volume was low. Additional application of LFCIC could enhance the cumulative infiltration volume and velocity of transdermal diffusion. Difference appeared 2 hrs after and significant difference appeared 4 hrs after the application, and 13.8 Hz showed the optimal effect of transdermal delivery. **Conclusion** :Chief ingredients of SB could be absorbed through transdermal medication, and LFCIC can evidently enhance the amount and velocity of transdermal absorption of SB.

Key words transdermal absorption, iontophoresis, low frequency complex impulse current, Secretio Bufonis

经皮吸收给药研究是发展较快的交叉学科领域。中医的皮肤给药历史悠久,但多为粗制的中药制剂。蟾酥具有清热解毒,止痛开窍的功能^[1]。脂蟾毒配基、华蟾酥毒基是蟾酥的质控成分^[2],蟾毒灵在蟾酥中含量亦较高,并是蟾酥中的抗肿瘤的主要有效成分^[3,4]。本研究以经皮低频复合脉冲刺激的模式,减少或避免了皮肤极化,使跨皮肤的电流强度不以指数关系衰减;采用改良的药物扩散池;用高效液相色谱仪测定蟾酥各种成分的经皮吸收量和计算经皮吸收速率;观察家兔皮肤对蟾酥的吸收特点;旨在探讨低频复合脉冲电流对中药蟾酥各种成分的经皮吸收的影响作用和规律。

材料与方法

1 药品及试剂 蟾酥,购自安徽药品公司;蟾毒灵(Bufalin)标准品购自美国 Sigma 公司,脂蟾毒配基(recibufo-genin)、华蟾酥毒基(cinobufagin)标准品购自中国药品生物制品鉴定所,乙腈为色谱纯,甲醇、乙醇、三氯甲烷等试剂均为分析纯。

2 动物 日本大耳白兔,雄性,体重(2.0±0.1)kg,中国中医研究院动物所提供。

3 仪器 高效液相色谱仪,日本岛津 LC-8A。Heraeus 低温离心机,labofage 400R。NX-1 型药物经皮吸收仪(复合脉冲、复合方波,0~30Hz),自行设计,博德电器制作所生产。

4 渗透实验装置 采用水平式三室离体经皮扩散池(见图 1),整个装置由流通扩散池、恒温水浴、恒流蠕动泵等几部分组成。流通扩散池由两个玻璃

^{*} 教育部骨干教师(振兴行动计划)课题、国家中医药管理局资助课题(No. 2000-J-P-27)

北京中医药大学(北京 100029)

[△]现为第二军医大学在读博士研究生

通讯作者 牛欣, Tel 010-64286975, E-mail niuxin@bjucmp.edu.cn

万方数据

圆筒和一个带恒温水套层的杯状体组成,杯状体内置接受液,做接受室。杯状体连接恒流蠕动泵,使接受液循环流动,模拟体内的漏槽条件。设置玻璃圆筒组成两个供给室,动物皮肤分别固定于其下端,角质层朝向供给室方向,药物置于供给室中,为保持皮肤两面压力平衡,供给液和接受液面基本一致。两个供给室分别留出电极插孔,连接低频电磁复合脉冲导入仪的电极。采用恒流蠕动泵以保证药物只在所实验的低频电脉冲的电流作用下被动扩散进入体内。

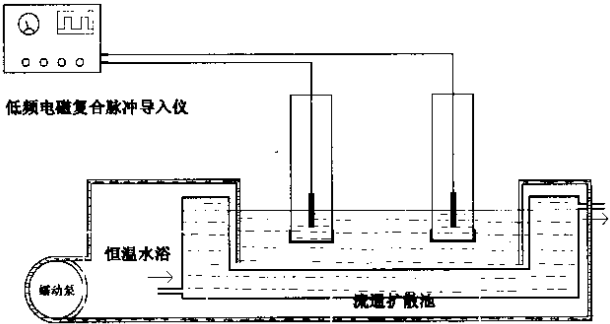


图 1 水平式三室离体经皮扩散池

5 蟾酥样品液的制备 将块状蟾酥经粉碎机粉碎,取蟾酥粉,置索氏提取器内,加氯仿回流提取至浸出液无色,回收氯仿至尽,残留物用 95% 乙醇溶解并定容。

6 离体兔皮的制备 家兔背部皮肤经脱毛剂脱毛后,饲养 24 ~ 48h,处死,分离背部皮肤,剔除皮下组织,用生理盐水洗净备用。

7 将兔皮固定于离体经皮扩散池上,使角质层面向供药池,供药池内各加入 2ml 蟾酥样品液,接受池中加入 20% 甲醇溶液 25ml,连通蠕动泵使接受液保持循环状态,外周池内水温保持在 $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ 。实验分为不施加任何干预措施的单纯给药(蟾酥)对照组,另设给药(蟾酥)加 5.3Hz、13.8Hz、30Hz 复合方波脉冲(空载电压为 40 伏)组。于实验开始后第 0.5、1、1.5、2、3、4、5、6、7、8h 各取样 1ml,同时补充 20% 甲醇液 1ml 至接受池中,所有样品离心后取上清,用高效液相色谱仪测定。

8 高效液相测定条件 色谱柱为 CLC-ODS C_{18} 分析柱,流动相为乙腈-水(50:50),流速为 1ml/min,检测波长为 297nm,衰减度为 4。

9 实验结果处理 所有样品以高效液相测定,外标法定量,测定蟾酥中三成分各时间点所取样品中浓度,计算累积渗透量、稳态经皮速率。累积渗透量: $Q_t = C_n + V_0/V \sum \text{CPS}$ (C_n 为时间 t_n 的浓度测量值; V

为接收介质总体积; V_0 为取样体积; CPS: 时间 t_n 以前的浓度测量值)。扩散达到稳态,经皮速率 $J_s = dM/dt = PC_0$,即累计渗透量-时间曲线的直线部分的斜率。 C_0 为供给室中的药物浓度, P 为药物在皮肤内的渗透系数。

结 果

1 蟾酥中成分线性关系 以对照品进样量为横坐标,峰面积积分值为纵坐标,回归方程为:蟾毒灵, $Y = 995151X - 3829.0$, $R = 0.998$ 华蟾酥毒基, $Y = 642998X + 4648.1$, $R = 0.999$; 脂蟾毒配基, $Y = 1588842X - 3159.5$, $R = 0.999$ 。

2 蟾毒灵、华蟾酥毒基、脂蟾毒配基的回收率分别为 100.56%、101.48%、101.97% 精密度实验显示蟾毒灵、华蟾酥毒基、脂蟾毒配基的相对标准偏差(RSD)分别为 1.37%、1.18%、0.54%。干扰性实验中,取经过水平式三室离体经皮扩散池的溶液(未加蟾酥提取液)入高效液相检查,结果显示在 297nm 的检测波长下,无明显干扰峰的出现。

3 蟾酥三种成分各组透皮累积渗透量比较见表 1 ~ 3。

表 1 各时间点蟾毒灵的累积渗透量 ($n = 6, \mu\text{g/ml}, \bar{x} \pm s$)

时间(h)	对照组	5.3Hz 复合组	13.8Hz 复合组	30Hz 复合组
0.5	△	△	△	△
1	0.005 ± 0.004	△	△	△
1.5	0.066 ± 0.042	0.025 ± 0.012	0.012 ± 0.012	0.245 ± 0.177
2	0.103 ± 0.064	0.141 ± 0.036	0.109 ± 0.068	0.413 ± 0.301
3	0.252 ± 0.116	0.275 ± 0.076	0.477 ± 0.285	0.650 ± 0.292 *
4	0.311 ± 0.139	0.716 ± 0.207	1.045 ± 0.424 *	1.654 ± 0.676 *
5	0.349 ± 0.144	1.203 ± 0.255 *	1.943 ± 0.473 *	2.290 ± 0.742 **
6	0.648 ± 0.164	2.079 ± 0.343 **	2.946 ± 0.916 **	3.064 ± 0.746 **
7	0.777 ± 0.033	3.057 ± 0.432 **	5.165 ± 1.505 **	4.793 ± 1.084 **
8	0.915 ± 0.194	3.949 ± 0.532 **	6.161 ± 1.627 **	5.541 ± 0.886 **

注 与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; △表示在本实验高效液相条件下,峰面积很小,无法准确定量,下表同

表 2 华蟾酥毒基的累积渗透量 ($n = 6, \mu\text{g/ml}, \bar{x} \pm s$)

时间(h)	对照组	5.3Hz 复合组	13.8Hz 复合组	30Hz 复合组
0.5	△	△	△	△
1	0.124 ± 0.124	△	△	△
1.5	0.286 ± 0.182	△	0.027 ± 0.027 **	0.793 ± 0.789 **
2	0.486 ± 0.321	0.071 ± 0.045 **	0.565 ± 0.365	1.200 ± 1.220 *
3	0.911 ± 0.437	1.088 ± 0.536	1.399 ± 0.828	1.677 ± 1.363 *
4	1.168 ± 0.515	2.569 ± 1.243 *	3.693 ± 1.33 *	4.155 ± 2.684 **
5	1.279 ± 0.521	5.561 ± 1.647 *	5.705 ± 1.948 *	5.742 ± 3.024 **
6	2.013 ± 0.626	8.831 ± 2.066 **	8.953 ± 2.495 **	7.295 ± 2.639 **
7	2.532 ± 0.217	15.85 ± 3.25 **	12.30 ± 3.32 **	13.79 ± 3.863 **
8	3.051 ± 0.793	17.75 ± 3.057 **	16.34 ± 4.009 **	15.10 ± 3.534 **

4 低频脉冲复合电流作用下,蟾酥 3 种成分在 3 种不同电脉冲频率下,体外经皮渗透参数有不同的改变

表 3 脂蟾毒配基的累积渗透量 ($n = 6, \mu\text{g/ml}, \bar{x} \pm s$)

时间(h)	对照组	5.3Hz 复合组	13.8Hz 复合组	30Hz 复合组
0.5	△	△	△	△
1	0.052 ± 0.036	△	△	△
1.5	0.097 ± 0.048	△		
2	0.118 ± 0.06	0.063 ± 0.042	0.017 ± 0.017 *	0.166 ± 0.115 *
3	0.183 ± 0.084	0.254 ± 0.084	0.234 ± 0.151	0.224 ± 0.164 *
4	0.207 ± 0.094	0.703 ± 0.202 *	0.716 ± 0.232 *	0.428 ± 0.239 *
5	0.267 ± 0.097	1.287 ± 0.316 *	1.056 ± 0.319 *	0.925 ± 0.395 **
6	0.435 ± 0.087	1.959 ± 0.442 **	1.721 ± 0.376 **	1.145 ± 0.321 *
7	0.555 ± 0.074	3.526 ± 0.641 **	2.333 ± 0.500 **	1.501 ± 0.191 **
8	0.697 ± 0.140	3.952 ± 0.634 **	3.046 ± 0.604 **	2.516 ± 0.484 **
				2.952 ± 0.374 **

变与对照组比较, 13.8Hz 时, 蟾毒灵和脂蟾毒配基体外经皮渗透速率 ($0.961\mu\text{g}/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})$ 、 $2.396\mu\text{g}/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})$) 和皮肤内渗透系数 ($0.030\text{cm}/\text{h}$ 、 $0.095\text{cm}/\text{h}$) 为最大, 而华蟾酥毒基的体外经皮渗透速率和皮肤内渗透系数, 则在 5.3Hz 和 13.8Hz 时的参数非常接近 (分别为 $10.81\mu\text{g}/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})$ 、 $10.53\mu\text{g}/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})$ 和 $0.095\text{cm}/\text{h}$ 、 $0.093\text{cm}/\text{h}$)。3 种成分的经皮透过率呈现出一定的频率依赖关系。

讨 论

近年来药理研究证实, 蟾酥具有强心、升压、抗肿瘤、止痛、提高机体免疫力等作用。在我国很早就有蟾酥外用治疗癌痛、痈肿疔疮等疾病的记载, 但外用是否可达到体内有效药物浓度尚无实验研究报道。为观察蟾酥外用的吸收特点, 本实验建立了三室流通模型, 通过体外经皮试验的方法和结果, 推测中药在体内的吸收情况。其实验检测过程比在体情况下测定药物经皮吸收的生物利用度来讲, 相对简单, 费用也较低廉。并克服了因药物半衰期较短, 而在体血药浓度检测上的困难。

采用高效液相法测定蟾酥中脂蟾毒配基、华蟾酥毒基和蟾毒灵 3 种成分的方法稳定可靠。其精密性、重现性、回收率等都符合测定要求。

研究使用的脉冲电流, 通电时带电离子进入皮肤, 断电时电荷从皮肤上移去即去极化, 从而减少或

避免产生皮肤极化。同时跨皮肤的电流强度不会以指数关系衰退。在间歇通电的电场状态下, 刻意选择合适的频率, 使皮肤内极化完全消除后再通电, 理论上应该产生较好的药物离子导入的效果。我们设计制作了低频电磁振动药物皮肤导入装置, 对比单纯给予药物和外加低频电场对中药蟾酥经皮吸收的影响, 并比较不同频率的电磁波对蟾酥经皮吸收的影响。实验结果表明蟾酥外用可通过皮肤被吸收, 但通过皮肤的量较少, 外加低频复合脉冲电流可明显提高蟾酥经皮吸收的累积渗透量和经皮扩散速率, 基本上从第 2h 起就能看出差异, 第 4h 差异极为显著。表明外加低频复合脉冲电流可明显提高蟾酥的经皮吸收速率并提高蟾酥外用的利用率, 且随时间的延长, 效果有增大之势。从总体上比较不同频率的电磁波对蟾酥经皮吸收的影响, 在 13.8Hz 频率时, 促进蟾酥透过皮肤的效果较好。我们希望能结合物理方法, 控制蟾酥的透皮吸收量和吸收速率, 通过深入实验研究, 使外用蟾酥在临床上使用达到安全、增效的目的, 更好地发挥外用中药的作用和优势。

参 考 文 献

- 1 苏永华, 牛欣, 张胜, 等. 蟾酥制剂的药效作用研究评述. 北京中医药大学学报 2001 24(2): 50—54.
- 2 中华人民共和国药典. 北京: 化学工业出版社, 2000: 316—317.
- 3 Jing Y, Ohizumi H, Kawazoe N, et al. Selective inhibitory effect of bufalin on growth of human tumor cells in vitro: association with the induction of apoptosis in leukemia HL-60 cells. Jpn J Cancer Res 1994 85(6): 645—651.
- 4 Hashimoto S, Jing Y, Kawazoe N, et al. Bufalin reduces the level of topoisomerase II in of human leukemia cells and affects the cytotoxicity of anticancer drugs. Leuk Res 1997 21(9): 875—883.

(收稿 2002-09-05 修回 2003-03-13)

《北京中医》2004 年征订启事

《北京中医》是中医、中西医结合综合性学术期刊, 双月刊、大 16 开, 为国际连续出版物, 中国自然科学核心期刊, 北京市 95 优秀期刊, 由北京中医药学会、北京中西医结合学会主办。统一刊号 ISSN1000-4599/CN11-2258/R。本刊面向基层, 注重临床实践, 突出中医特色和北京地区特色, 选登全国各地文章, 栏目多样, 编排规范, 内容充实新颖, 设有京都名医、老中医经验、临床报道、中药方剂、针灸经络、学术探讨、文献综述、专题笔谈、京华中医医院、疑难病研治、科研动态、短篇报道、成药研究等栏目。本刊附有英文目录, 适宜各级中医、中西医结合工作者和中医爱好者阅读, 欢迎广大读者订阅, 国内定价每册 6.50 元, 全年 39.00 元。国内代号 2-587, 各地邮局订购。国外代号 BM668, 中国国际图书贸易总公司(北京 399 信箱)订购。广告证号: 京东工商广字 0083 号。当地订阅不方便者, 本编辑部代办邮购。编辑部地址: 北京东单三条甲七号。邮政编码: 100005, 电话: (010) 65251589, 传真: (010) 65223477, 电子信箱: bjctcm@public3.bta.net.cn