

不同接受液和动物皮肤对格列美脲体外经皮渗透行为的影响^{*}

张 援¹, 许实波¹, 李向阳², 陈 颖³

(1. 中山大学药学院中药与海洋药物研究室, 广东 广州510275;

2. 湖南大学体育学院, 湖南 长沙 410082;

3. 广东省体育科学研究所广东省运动测试重点实验室, 广东 广州 510663)

摘 要: 建立格列美脲体外透皮吸收的 HPLC 分析方法, 采用改良 Franz 双室渗透扩散装置, 以累积渗透量、透皮速率常数和透皮时滞为评价指标, 研究了 5 种透皮吸收接受液和 6 种实验动物皮肤对格列美脲体外经皮渗透行为的影响。结果表明: ①所建立的 HPLC 方法在 $0.1 \sim 30 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 间线性良好, 高中低质量浓度样品的日内和日间相对标准偏差 RSD 均小于 3%, 最低检测质量浓度 $5.55 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 最低检测限 0.28 ng ; ②与其它接受液—生理盐水、乙醇/生理盐水、PEG400/生理盐水和 pH 7.4 磷酸盐缓冲液相比, 乙醇/PEG400/生理盐水具有最大的透皮速率常数和最短的透皮时滞; ③在大鼠、小鼠、裸鼠、豚鼠、猫和新西兰大白兔等动物皮肤中, 裸鼠的透皮速率常数最大, 豚鼠最小; 裸鼠的透皮时滞最短, 小鼠最长。另外, 在猫皮作为透皮实验皮肤的特性中, 发现猫皮透皮速率较小, 透皮时滞却较短。提示在格列美脲的体外透皮实验中, 采用乙醇 PEG400/生理盐水作接受液, 裸鼠皮肤作实验皮肤, 可获得最大的透皮速率常数和最短的透皮时滞。

关键词: 格列美脲; 透皮吸收; 接受液; 实验动物皮肤; 高效液相色谱法

中图分类号: R944 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2004) 05-0086-04

糖尿病作为一种现代慢性病, 近年来发病率逐年递增, 发病年龄逐渐年轻化。患者往往需要终身服药, 到病程晚期时, 还需要注射药物以维持生命。格列美脲 (Glimpiride, Gli), 商品名 Amaryl, 是第三代磺酰脲类口服降糖药的第一个品种, 1995 年首次在瑞典上市^[1]。格列美脲经肝代谢, 由大便和尿液排除。文献[2]报道与同类其它降糖药相比, 该药具有起效快, 作用强, 持续时间长, 剂量小等特点。但不良反应主要有低血糖症、视觉障碍、胃肠道紊乱及血细胞计数较低等, 老年患者及肝肾病患者应慎用^[3]。若将格列美脲开发成透皮吸收制剂, 可使药物避开肝脏首过效应及胃肠道破坏, 减少给药次数, 还可在药物出现副反应时随时终止给药, 具极其重要的实践意义。选择适合的透皮吸收接受液以及实验动物皮肤开展药物的体外经皮渗透行为研究, 是研制透皮吸收制剂的重要实验基础。本文以 5 种透皮吸收接受液和 6 种实验动物皮肤为材料, 以累积渗透量、透皮速率常数和透皮时滞为指标, 首次对格列美脲的体外透皮行为开展了比较研究, 目的是为格列美脲透皮制剂的开发研究提供依据。

1 材料与仪器

1.1 试 剂

格列美脲对照品(贵州圣济堂制药有限公司提供, $w=99.55\%$); 乙腈(HPLC 级, 美国 Fisher 公司); 甲醇(HPLC 级, 天津四有生物医学技术有限公司); PEG400(CP 级, 中国医药(集团)上海化学试剂公司); 苯, 无水乙醇, 邻苯二氢钾, 邻苯氢二钾等均为市售分析纯。水为去离子双蒸水。

1.2 仪 器

HP 1090 高效液相色谱仪(美国); DB-3D 型样品浓缩系统(英国 Techne (Cambridge) 公司); TP-2A 型双室渗透扩散池(中国药科大学); YKH-II 型液体快速混合器(江西医疗器械厂); HW-8B 型超级微量恒温器(上海浦江分析仪器厂); pHTestr 2 型酸度计(美国 Cole Parmer 公司)。

1.3 实验动物

Balb/c 裸鼠, Hartley 豚鼠由中山大学动物实验中心提供; SD 大鼠(合格证: 2002A024), NIH 小鼠(合格证: 2002A022), 新西兰家兔(合格证: 2002A025)由广东省医学实验动物中心提供; 家

* 收稿日期: 2004-01-13

作者简介: 张援(1967年生), 女, 博士, 现在广东省体育科学研究所工作;

通讯联系人: 许实波; E-mail: lsdb@zsu.edu.cn

猫, 由市郊养殖场购进。

2 方法与结果

2.1 格列美脲体外分析方法的建立

2.1.1 色谱条件 Diamonsil C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以乙腈—0.15% (φ) 冰醋酸溶液 (体积比为 7: 3) 为流动相, 流速 1 mL·min⁻¹, 检测波长 228 nm, 柱温 40 °C, ODS C₁₈ 保护柱连接于分析柱前。格列美脲的保留时间为 6.24 min。

2.1.2 样品预处理 精密吸取 0.5 mL 样品, 加入 3 mL 苯, 涡旋振荡混匀 3 min, 3 000 r/min 离心 10 min, 移出苯层, 水层用苯再提取一遍。合并苯层, 60 °C 氮气吹干, 残渣用 100 μL 甲醇重溶, 自动进样 10 μL 作 HPLC 分析。

2.1.3 贮备液的配制 用甲醇配制 0.5 mg·mL⁻¹ 的格列美脲对照品贮备液, 并用甲醇精密稀释成 0.1, 0.5, 2.0, 5.0, 10.0, 20.0, 30.0 μg·mL⁻¹ 的标准溶液。

2.1.4 标准曲线的绘制 精密吸取上述各标准溶液 0.5 mL, 60 °C 氮气吹干甲醇。再精密加入接受液 0.5 mL, 使接受液中格列美脲质量浓度分别为 0.1, 0.5, 2.0, 5.0, 10.0, 20.0, 30.0 μg·mL⁻¹, 按“样品预处理”项下方法提取测定。以样品峰面积 (A) 对样品浓度 (c) 作线性回归, 各接受液的标准曲线方程见表 1。结果显示, 不同接受液中, 格列美脲在 0.1~30 μg·mL⁻¹ 范围内线性良好。

2.1.5 方法精密度和提取回收率测定 用每一种接受液配制低、中、高 3 种质量浓度 (2.0, 5.0,

表 1 不同接受液中格列美脲的标准曲线方程
Tab 1 Calibration equation of glimepiride in different receptors

接受液	标准曲线方程	R ²
生理盐水	$A = 73.700c + 10.425$	0.9995
乙醇 / 生理盐水	$A = 72.170c + 41.967$	0.9959
乙醇 / PEG400 / 生理盐水	$A = 52.420c + 48.457$	0.9972
PEG400 / 生理盐水	$A = 110.555c - 18.247$	0.9941
pH7.4 磷酸盐缓冲液	$A = 89.815c + 2.840$	0.9997

10.0 μg·mL⁻¹) 的标准样品各 3 份, 经预处理后作 HPLC 分析, 于同 1 d 内以及连续 3 d 内分别测定 3 次, 计算日内和日间精密度。另取格列美脲贮备液, 用甲醇精密稀释后, 取等量标准样品直接进样, 记录峰面积, 计算不同接受液中格列美脲的提取回收率。结果见表 2。

由表 2 可见, 5 种接受液的日内和日间相对标准偏差均小于 3%。格列美脲在生理盐水和乙醇 / 生理盐水接受液中的提取回收率可达到 85% 以上, 在乙醇 / PEG 400 / 生理盐水和 PEG 400 / 生理盐水中的提取回收率在 80% 左右。

2.2 透皮吸收实验

2.2.1 离体皮肤的制备 将大鼠 (♂, (250±10) g), 小鼠 (♂, (30±2) g), 豚鼠 (♂, 350 g 左右), 10 周龄裸鼠 (♂), 新西兰家兔 (♀, (2.2±0.4) kg) 和猫 (♂, (5.5±0.2) kg) 的腹部毛用电动剃须刀剃净, 处死。立即剪取腹部皮肤, 仔细剥离皮下脂肪层和结缔组织, 用生理盐水冲洗干净, 置生理盐水中, 低温冰箱保存备用。实验前自然解冻, 并用生理盐水浸泡 30 min。

表 2 不同接受液的天内、日间精密度和提取回收率测定¹⁾
Tab 2 The inter-day and intra-day precision and extract recovery in different receptors

接受液	质量浓度 (μg·mL ⁻¹)	日内精密度		日间精密度		提取回收率	
		$\bar{x} \pm s^{1)}$	RSD / %	$\bar{x} \pm s$	RSD / %	$\bar{x} \pm s$	平均值 / %
生理盐水	2.0	162.790±2.405	1.48	162.904±2.704	1.66	87.26±1.22	86.87±0.29
	5.0	384.992±4.085	1.06	387.031±5.362	1.39	83.24±0.91	
	10.0	870.253±6.655	0.76	872.886±5.074	0.58	90.11±0.63	
乙醇 / 生理盐水	2.0	165.279±1.640	0.99	165.282±2.784	1.68	88.77±1.22	87.80±0.39
	5.0	386.877±5.779	1.49	385.757±4.888	1.27	83.34±0.97	
	10.0	882.804±5.937	0.67	882.241±2.630	0.30	91.28±0.46	
乙醇 / PEG400 / 生理盐水	2.0	144.026±3.469	2.41	143.549±2.430	1.69	77.24±1.62	79.37±0.59
	5.0	375.275±6.023	1.61	373.042±4.934	1.32	80.72±1.06	
	10.0	776.594±2.336	0.30	773.916±5.015	0.65	80.16±0.44	
PEG400 / 生理盐水	2.0	144.730±3.581	2.47	144.933±2.601	1.79	77.77±1.68	78.54±0.69
	5.0	368.663±4.480	1.22	367.996±3.730	1.01	79.42±0.73	
	10.0	759.172±4.014	0.53	759.568±3.764	0.50	78.41±0.33	
pH 7.4 磷酸盐缓冲液	2.0	149.153±3.944	2.64	145.996±3.864	2.65	79.40±2.32	83.54±0.88
	5.0	374.039±3.314	0.89	382.128±4.819	1.26	81.38±1.38	
	10.0	866.815±4.594	0.53	869.262±6.951	0.80	89.83±0.57	

1) ($\bar{x} \pm s$) / (μg·mL⁻¹), n = 3
(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

2.2.2 渗透扩散装置和实验方法 采用改良 Franz 双室渗透扩散装置，扩散面积 2.296 cm²。离体皮肤角质层面向扩散池，固定。扩散池加入 2.5 mL 质量浓度为 5 mg·mL⁻¹ 的格列美脲乙醇溶液；接受池注入 16 mL 接受液，水浴维持 (37.1±0.2) °C，恒速搅拌。透皮实验开始稳定 20 min 后，于 1, 2, 4, 6, 8, 10, 24 h 取样 2 mL，并补充等体积同温的空白接受液。不同时间点样品液按“2.1.2”项预处理，进样 10 μL 作 HPLC 分析。测得的样品峰面积，代入表 1 的标准曲线方程中换算成药物浓度，再按以下公式计算累积渗透量 Q 。

$$Q = \left[16c_n + \sum_{i=1}^{n-1} 2c_i \right] A$$

式中， c_n 为第 n 个取样点浓度 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)， c_i 为第 i 个取样点质量浓度 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)， A 为扩散面积 (cm^2)。以 Q 对时间 t 作线性回归，所得 $Q-t$ 直线方程的斜率即为透皮速率常数 J ($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$)。增透倍数 $E_r = J/J_0$ (J_0 : 生理盐水接受液的渗透速率)，渗透系数 $K_r (\text{cm} \cdot \text{h}^{-1}) = J/c_0$ (c_0 : 扩散池中的药物初始质量浓度， $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)。

2.2.3 不同接受液对格列美脲体外经皮渗透行为的影响 分别以生理盐水，乙醇/生理盐水（体积比为 3:7），PEG400/生理盐水（体积比为 4:6），pH 7.4 磷酸盐缓冲液，乙醇/PEG400/生理盐水（体积比为 5:2:3）为接受液，按“2.2.2”项研究格列美脲透过大鼠皮肤的行为特性，并计算不同接受液的透皮速率常数 J 和增透倍数 E_r （表 3）。

表 3 反映出不同接受液对格列美脲的透皮速率常数影响较大。其中，乙醇/PEG400/生理盐水的 J 值最大，增渗能力是生理盐水的 25 倍；乙醇/生理盐水、pH 7.4 磷酸盐缓冲液和 PEG400/生理盐水的 J 值依次减少。另外，还可看出透皮速率常数 J 的增大和透皮时滞的缩短并无明显相关关系，乙醇/生理盐水接受液的透皮时滞最长，乙醇/PEG400/生理盐水的透皮时滞最短。

2.2.4 不同实验动物皮肤对格列美脲体外经皮渗透行为的影响 以乙醇/PEG400/生理盐水（体积比为 5:2:3）为接受液，分别研究格列美脲透过大鼠皮肤，小鼠皮肤，裸鼠皮肤，豚鼠皮肤，家兔皮肤和家猫皮肤的行为特性（图 1）。6 种皮肤的透过速率常数 J 和渗透系数 K_r 见表 4。

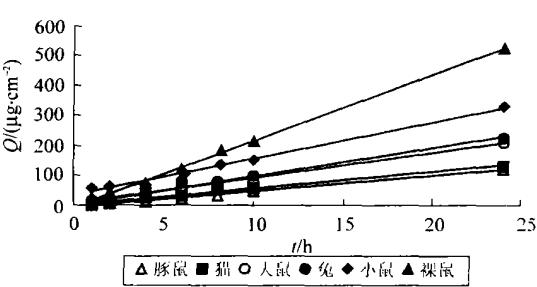


图 1 乙醇/PEG400/生理盐水接受液中格列美脲透过不同动物皮肤的渗透曲线
Fig 1 The permeation profile of Glimperide through different skins in vitro in EtOH/PEG400/saline receptor ($n = 3$)

表 3 格列美脲在不同接受液中的体外透皮吸收动力学参数
Tab 3 The kinetic parameters of permeability of glimepiride in different permeation receptors

接受液	$Q-t$ 方程	R^2	J ($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$)	透皮时滞 h	E_r	24 h 累积 透过量 μg
生理盐水	$Q = 0.3371t - 0.1507$	0.9849	0.3371	0.4470	1.000	7.8790
乙醇/生理盐水	$Q = 2.2078t + 8.6051$	0.9910	2.2078	3.8976	6.549	60.6223
乙醇/PEG400/生理盐水	$Q = 8.5696t + 3.6486$	0.9925	8.5696	0.4258	25.422	211.2971
PEG400/生理盐水	$Q = 1.2790t + 2.3594$	0.9759	1.2790	1.8447	3.7941	31.6517
pH 7.4 磷酸盐缓冲液	$Q = 1.4098t + 0.6317$	0.9935	1.4098	0.4481	2.9665	34.2938

表 4 不同实验动物皮肤在乙醇/PEG400/生理盐水接受液中的体外透皮吸收动力学参数

Tab 4 The kinetic parameters of permeability of glimepiride via different exercised animal skins in EtOH/PEG400/saline receptor

动物皮肤	$Q-t$ 方程	R^2	J ($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$)	透皮时滞 h	$K_r \times 10^3$ ($\text{cm} \cdot \text{h}^{-1}$)	24 h 累积 透过量 μg
大鼠	$Q = 8.5696t + 3.6486$	0.9925	8.5696	0.4258	1.7139	211.2971
小鼠	$Q = 12.2850t + 33.2180$	0.9940	12.2850	2.7039	2.4570	330.3781
豚鼠	$Q = 5.3236t - 6.4640$	0.9960	5.3236	1.2142	1.0650	121.7221
裸鼠	$Q = 22.0720t - 4.9678$	0.9810	22.072	0.2251	4.4140	524.760
家兔	$Q = 9.4763t + 3.6779$	0.9891	9.4763	0.3881	1.8953	227.8306
猫	$Q = 5.7374t - 1.3012$	0.9922	5.7374	0.2268	1.1475	134.1653

表 4 中，不同皮肤透皮速率常数和渗透系数的大小顺序依次是：裸鼠> 小鼠> 家兔> 大鼠> 猫> 豚鼠；透皮时滞的顺序是：裸鼠< 猫< 家兔< 大鼠< 豚鼠< 小鼠。其中，裸鼠的透皮速率常数和渗透系数最大，透皮时滞也最短。

3 讨 论

有关格列美脲提取方法的研究国内文献报道较少。本文曾分别用氯仿和二氯甲烷代替苯作萃取溶剂，发现它们的提取回收率仅为苯溶剂的 85% 左右，故仍采用苯作为本方法的萃取溶剂。本文还建立了透皮接受液中格列美脲的 HPLC 测定方法，在所用色谱条件下基线波动小，样品保留时间短，峰形对称性好，能与皮肤在渗透过程中脱落的杂质分离完全。方法学研究表明，样品测定的线性范围广（0.1~30 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ），日内和日间测定相对标准偏差均小于 3%，最低检测质量浓度 5.55 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ （ $S/N=3$ ），最低检测限可达到 0.28 ng，具有快速简便，灵敏度高，重现性好等优点。

由于格列美脲在水中的溶解度较小，为了便于透皮吸收研究，本文在生理盐水接受液中分别加入 PEG400 和乙醇，以考察二者对格列美脲透皮吸收行为的影响。结果表明，和生理盐水相比，乙醇/PEG400 生理盐水（体积比为 5:2:3）接受液的增渗倍数高达 25.422，分别是乙醇/生理盐水和 PEG400 生理盐水接受液的近 4 倍和 7 倍，提示乙醇和 PEG400 对格列美脲透皮吸收具有协同作用，这为将来的制剂配方组成提供了实验依据。此外，本文还采用常见的 pH 7.4 磷酸盐缓冲液作为接受液，但发现其增渗倍数仅为 2.967，这可能与格列

美脲的化学性质有关。

透皮吸收研究中实验皮肤的选择对预测药物的透皮特性有重要意义。目前认为小猪、猴、和蛇蜕等与人皮肤较为相似，但由于皮肤来源的关系，大鼠、小鼠和兔皮仍常用作透皮吸收实验皮肤，豚鼠皮也偶见报道。本文系统研究了几种动物皮肤对格列美脲透皮行为的影响，并在国内首次报道猫皮的透皮吸收行为。结果显示，裸鼠的透皮速率常数最大，豚鼠最小；裸鼠的透皮时滞最短，小鼠最长。猫皮的透皮速率常数和豚鼠差不多小，但透皮时滞却几乎和裸鼠一样短。兔皮的透皮速率常数和透皮时滞在 6 种动物皮肤中均居中，但由于面积较大，常用于多个实验组之间的平行和对照研究，可避免皮肤的个体差异。综上所述，本文实验结果表明，在格列美脲的体外透皮实验中，采用乙醇/PEG400/生理盐水作接受液，裸鼠皮肤作实验皮肤，可获得最大的透皮速率常数和最短的透皮时滞。

参考文献:

[1] 姚春芳. 降血糖药格列美脲首次获得批准[J]. 国外医学药学分册, 1996, 23(1): 59.

[2] ROSENKRANZ B, PROFOZIC V, METELKO Z, et al. Pharmacokinetics and safety of glimepiride at clinically effective doses in diabetic patients with renal impairment[J]. Diabetologia, 1996, 39(12): 1617.

[3] 刘萍(边强审校). 糖尿病治疗药格列美脲[J]. 国外医药——合成药生化药制剂分册, 1997, 18(5): 276.

[4] 郑俊民. 经皮给药新剂型[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1997.

[5] 梁秉文. 经皮给药制剂[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1992.

The Effect of Different Permeation Receptors and Various Exercised Animal Skin on the Percutaneous Permeability of Glimepiride *in vitro*

ZHANG Yuan¹, XU Shi bo¹, LI Xiang yang², CHEN Ying³

(1. School of Phamaceutical Sciences, Sun Yat -sen University, Guangzhou 510275, China;
2.School of Physical Education, Hunan University, Changsha 410082, China;
3.Guangdong Provincial Key Laboratory for Sports Test,
Guangdong Research Institute of Sports Science, Guangzhou 510663, China)

Abstract: RP HPLC method of glimepiride in different permeation receptors was established in this article. Using improved Franz type two-chamber diffusion cell, the *in vitro* permeation test of glimepiride ethanol solution via 5 kinds of isolated animal skin and in 6 kinds of permeation receptors was respectively carried out by adopting cumulative permeation quantity (Q), stability permeation rate (J) and permeation lagged time (t_{lag}) as permeability index. The results showed that: ① In this HPLC method, the glimepiride concentration in different permeation receptors was linear over the range of

0.1~30 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and the RSD inter day and intra day were both less than 3%. The minimal detectable concentration and amount were 5.55 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ and 0.28 ng respectively. ② Compared with other permeation receptors saline, EtOH/saline, PEG400/saline and pH 7.4 phosphate buffer, EtOH/PEG400/saline (5:2:3, V/V) had the largest J and the shortest t_{lag} . ③ Among the animal skin exercised from rat, mouse, hairless mouse, guinea pig, rabbit and cat, hairless mouse skin had the largest J whereas the guinea pig had the smallest; the t_{lag} of hairless mouse skin was the shortest but that of mouse was the longest. Furthermore, the cat skin was first reported as permeation skin. Although the stability permeation rate of the cat skin was almost the same small as that of the guinea pig, its permeation lagged time was the same short as that of the hairless mouse. It suggested that when glimepiride permeated through hairless mouse skin *in vitro* and in the EtOH/PEG400/saline permeation receptor, it had the largest J and the shortest t_{lag} .

Key words: *Glimepiride*; amaryl; TDDS; permeation receptor; animal skin; HPLC

· 简 讯 ·

《现代密码学与金融信息安全技术》一书出版

由中山大学数计学院副教授王泽辉编著的《现代密码学与金融信息安全技术》一书，已由暨南大学出版社出版。与同类著述相比，该书有如下特色。其一，根据作者提出的（带与不带冗余）开关变换的思路，读者可较快捷了解 IDEA、AES 等对称密制及 RSA、ElGamal 等公匙密制的设计思想，并用所提供的开关变换构件设计新的密码体制。其二，提供大量实例可追踪现代信息安全技术（也适合金融领域以外），提供了素数加速测试、ECC 实用参数设置等优化技术及许多算法伪代码，读者可据以编程序实现技术，内容涵盖密钥交换、密钥分拆与重构、零知识证明、抗抵赖数字签名、数字现金等。其三，采取难易分拆、错开编排、辟第 X 节的特有处理，既适合浅、中层次读者高效切入技术核心，又有适合高层读者继续探索内容，如 NTRU 密码体制、量子密码学、概率加密技术。中山大学前校长李岳生教授对该书的评价是“该书讲出了密码学的计算数学特色”，“密码学的数学基础、加密解密方法、算法和编码及其在计算机上的实现，贯通起来，一气呵成”。

本书可作为高等院校计算机科学、信息科学、金融学、通信工程、应用数学等专业的本科生教材及研究生教学参考书，也可以作为通信系统、金融系统、网络与电子商务系统的技术培训教材和实用工具书，全书 44.2 万字。

（本刊通讯员）