

行政院國家科學委員會專題研究計畫 期中進度報告

利用經個別皮膚的生化參數與基因多型性因子標準化之皮膚滲透係數以建構滲透係數與結構特質之定量相關性(2/3)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC94-2320-B-038-011-

執行期間：94年08月01日至95年07月31日

執行單位：臺北醫學大學藥學系(所)

計畫主持人：許明照

報告類型：精簡報告

報告附件：出席國際會議研究心得報告及發表論文

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 95 年 6 月 1 日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫 成果報告
 期中進度報告

利用經個別皮膚的生化參數與基因多型性因子標準化之皮膚滲透係數以建構滲透係數與結構特質之定量相關性(2/3)

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 94-2320-B-038-011

執行期間：94年8月1日至95年7月31日

計畫主持人：許明照

共同主持人：

計畫參與人員：楊鈞仁

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告 完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

- 赴國外出差或研習心得報告一份
- 赴大陸地區出差或研習心得報告一份
- 出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
- 國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年 二年後可公開查詢

執行單位：台北醫學大學

中華民國九十五年五月三十日

行政院國家科學委員會專題研究計畫期中報告

利用經個別皮膚的生化參數與基因多型性因子標準化之皮膚滲透係數以建構滲透係數與結構特質之定量相關性(2/3)

Construction of Quantitative Structure Permeability Relationship (QSPR) with Skin Permeability Normalized to Biological Parameters/Genetic Polymorphism of Individual Skin(2/3)

計畫編號：NSC 94-2320-B-038-011

執行期限：94 年 8 月 1 日至 95 年 7 月 31 日

主持人：許明照 台北醫學大學 藥學系

一、中文摘要

以往經皮給藥的研究，通常沒有去估算探討不同個體間皮膚相關參數的差異，將其影響忽略不計，因而此變因可能是穿皮實驗數據結果產生誤差的原因之一。本研究期望能建構一個值得信賴的皮膚滲透係數式(Quantitative Structure- Permeation Relationships, QSPeRs)，藉由探討影響皮膚特性的幾個重要因子(皮膚含水量、經皮水分散失程度、皮膚彈性以及角質層 Ceramide 含量或 Ceramide 相關特性等)，以數學方程式預估藥物滲透皮膚之情形。

本年度的實驗主軸是利用逆相高效液相層析法 (reversed-phase high performance liquid chromatography, HPLC) 以不同比例之水與甲醇 (methanol) 作沖提建立一個簡單、方便且快速之分析方法，適宜用在本研究所選用的十種非類固醇抗發炎性類藥物(Non-Steroid Anti-inflammation Drugs, NSAID)，將此方法運用在分析 NSAID 藥物溶解度試驗以及體外穿皮研究的檢品。本研究使用 10 種 NSAID 藥物透過體外經皮擴散給藥裝置(Franz type diffusion cell)的分析方法，以裸鼠皮(品種為 BALB/c)作為經皮給藥之對象，配合分析藥物滲透之結果。在經皮給藥前，先將裸鼠以皮膚經皮水分散失儀(MPA580, Courage- Khazaka, Electronics, Koln, Germany) 測量個別裸鼠之皮膚相關特性。

研究結果顯示，裸鼠皮膚在適溫下(20-25°C)的含水量約為 40~75% 不等；表皮水分散失率約為 4~9 g/hm²，彈性係數平均為 0.359，到底哪個皮膚的因子是影響藥物穿透的最關鍵因素，抑或每個因子之間均有連鎖反應，俟未來獲得更多龐大的實驗數據再行分析探討。往後將更深入探討不同皮膚間 Ceramide 的特性跟含量以及皮膚結構組成的特性，再將這些參數對個體皮膚的差異進行標準化後再迴歸運算，如此更能提高運用 QSPeRS 預測滲透係數的準確度。

關鍵詞：經皮給藥，高效液相層析法，皮膚彈性，Ceramide

Abstract

In past transdermal research, the structural properties of the skin are the most important factor to affect the drug permeability. However, the variability of individual skin was not considered in these studies when measurements of skin permeability or flux were taken. In this study, it is the aim to construct the mathematical models (Quantitative Structure - Permeation Relationships, QSPeRs) that can predict the condition of drug delivery system. The parameters in this mathematical model may be the ceramide content in stratum corneum, skin hydration, transepidermal water loss (TEWL) and skin elasticity.

In the second year study, a reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) method is proven to analysis the Non-Steroid Anti-inflammation Drugs (NSAID). The nude mice skin is the skin model. Before transepidermal study, the nude mice will be measured by TEWL and other skin parameters. Afterwards, the correlation between TEWL and other skin parameters will be constructed to express structural effect on skin permeability. Therefore, the improvement in the fitting regression of QSPeRs with normalized skin permeability is expected and prediction of skin permeability for each individual is anticipated.

Keywords: transdermal, QSPeRs, HPLC, TEWL, permeability

二、緣由與目的

局部給藥系統即是藥物自外界穿透皮膚進入血液循環而達到局部或全身性作用。利用此種投藥方式較傳統口服劑型優越之處在於：1) 可避免肝臟首度效應 (hepatic first-pass metabolism)。2) 減少藥物進入體循環，降低藥物副作用。3) 製成貼布的持續吸收劑型，可減少給藥次數，增加病人服從性。4) 若不良反應發生時，可立即移除。而局部給藥系統的藥效主要決定於藥物皮膚穿透量，考慮藥物穿透皮膚的因素，除了藥物物化性質必須配合，還有皮膚的結構。已有許多體外穿皮研究證明，藥物本身的特性，如分子量、分子體積以及脂溶性大小(常以正辛醇與水分配係數代表， $K_{o/w}$)皆是影響藥物穿透能力的重要因子；另外，處方溶媒的溶劑組成參數也是該考慮的重點，如 pH 值的大小、是否含有界面活性劑以及經皮給藥的

藥物濃度大小等等。

一般而言，角質層是人體抵禦外界物體侵入的最大屏障，但在一般穿皮吸收的投藥過程中，卻是最大的阻礙。角質層主要是由 Keratin 以 Lipid matrix 所架構而成，Keratin 是一種親水性的蛋白質，鑲嵌在脂溶性的 Lipid matrix 當中。如果把角質層想像成一面水泥牆的話，Keratin 就像是水泥牆中的磚塊而 lipid matrix 就像是水來形成基本骨架。由角質層結構可推知，藥物穿透皮膚的路徑，主要為(1) 穿透角質層 (stratum corneum) 細胞內；(2) 穿透角質層細胞間空隙；(3) 經由汗腺、毛囊等附屬器官穿過，但大多數還是以穿透角質層細胞間空隙為穿透的主要途徑。而角質層細胞間空隙主要成分為脂質(lipid)，其組成約佔角質層淨重的 10-15%。而就脂質含量詳細比例來探討，含量最多的是 Ceramide，就佔了約 50%；其次則是 Cholesterol，約佔 25%；再來是游離脂肪酸(Free fatty acid)約佔 15%，而其中又以 Ω -不飽和脂肪酸佔大多數，如亞麻油酸或次亞麻油酸；其它成份約佔 10%左右，由此可看出 Ceramide 在角質層中的重要性。

而有許多醫學研究證實，角質層中 Ceramide 含量的多寡也是評估皮膚健全程度的重要指標，在常見疾病患者身上，如牛皮癬、魚鱗癬及異位性皮膚炎病患身上取得的皮膚進行 Ceramide 含量測定，實驗結果發現在這些損傷的皮膚角質層 Ceramide 的含量約是健康受試者皮膚的 Ceramide 含量的一半。因此當皮膚 Ceramide 含量越高則代表皮膚組織排列越緊密越健全，Ceramide 含量越低則代表皮膚組織可能損傷排列鬆散；因此可以合理推斷，Ceramide 的含量應該會與藥物穿透能力有關，當 Ceramide 含量越低時藥物穿透的效果就會越好，Ceramide 含量越高則

藥物越不容易穿透皮膚。所以 Ceramide 含量測定及相關特性表現也是本研究所要觀察的重點，希望能藉此評估不同各體皮膚間特性參數的差異。

本研究選用非類固醇抗發炎性類藥物 (NSAID) 來進行經皮給藥研究，近年來 NSAID 類藥物的臨床治療研究發現，NSAID 的藥物如 Ibuprofen、Diclofenac 及 Indomethacin，在解熱陣痛方面都有相當好的療效，另外在類風濕性關節炎(RA)及退化性關節炎(OA)的治療也有顯著的效果。而 NSAID 類藥物經皮給藥治療與傳統的口服及注射劑型來比較的話，經皮給藥系統的優點為它是一種非侵入性的治療途徑；另外，經皮給藥系統可以避免掉首度代謝效應的影響以提高藥物的可用率及避免多種藥物在體內的交互作用影響！比如說一些年紀較大的病患，通常都不只罹患單一種的疾病，所以常常需要併服許多種疾病治療的藥物，如果又與 NSAID 類藥物併服的話，可能會引起不必要的副作用。因此經皮給藥投與 NSAID 藥物可以讓病患服藥更方便而有更好的服藥順從性。

然而，一般經皮給藥系統的缺點在於其吸收過程會受到皮膚角質層的阻擋，所以需要較高劑量的藥物才能達到所需的治療效果。所以，若可以建構出經皮給藥系統相關特性與藥物滲透力(permeability)之間的關係式，也許能成功評估出不同藥物在各種疾病經皮給藥治療上所需的藥物劑量，以期達到最理想最安全的臨床療效。

由於皮膚滲透力 (permeability) 是描述滲透質經由皮膚吸收之效能的重要指標，所以在之前研究中經常利用結構與滲透力定量關係(QSPeRs) 作為預測滲透質經由皮膚吸收。傳統上 QSPeRs 是建立在皮膚滲透力與滲透質之分子量、正辛醇與水分分配係數 ($K_{o/w}$) 之間的關係。此關係式能

夠合理的定量描述透過皮膚的吸收，對一些親脂性的藥物的預測結果也蠻合宜的，然而個體皮膚間的差異通常都會被忽略。在之前的實驗中經常會使用一系列不同結構性的滲透質在不同的皮膚樣品進行測試，並取其平均值當做各個滲透質的皮膚滲透力，再依照不同理論模式迴歸評估不同滲透質結構特性對皮膚滲透力的定量關係，以作為預估理論值之應用，但在運算過程並沒有考慮個體間皮膚的差異，所造成皮膚滲透力數值的偏差性，而此偏差性可能會是評估皮膚滲透力時最大的變異來源，因此在運用會受皮膚差異所影響的皮膚滲透力時應對個體皮膚的差異進行標準化後再迴歸運算，如此才能提高藉由此結構與皮膚滲透力關係式預測滲透係數的準確度。

有鑑於此，本研究希望能運用皮膚特性的相關參數，如：皮膚含水量、經皮水分散失程度(Transepidermal water loss, TEWL)、皮膚油脂含量以及皮膚彈性係數來對不同個體間皮膚的差異進行標準化後再迴歸運算，以期求得更精確可靠的 QSPeRs 關係式。經皮水分散失(TEWL)數值常被運用來評估皮膚防禦能力的指標，當 TEWL 值顯著上升通常意味著皮膚生理功能的損傷，近年來的研究也證實了 TEWL 數值與經皮吸收的程度有很高的相關性，因此 TEWL 數值應為重要的參考評估指標。此外，在角質層脂質的組成當中，Ceramide 是相當重要的物質，因此 Ceramide 的相關分析實驗也將是所要探討的重點。最後，影響皮膚穿透力的皮膚結構特質，將可藉由 Ceramide 相關特性以及水分經皮散失之間關聯性來表現。因此，藉由校正皮膚穿透力以改善 QSPeRs 迴歸準確性，以及預測不同個體間皮膚穿透力將是未來可預期的方向。

三、材料與方法

個別皮膚特性測量

在個別裸鼠皮膚特性測定的實驗中，裸鼠品種為 BALB/c，6 至 8 週裸鼠；使用的儀器是 MPA580, Courage-Khazaka, Electronics, Koln, Germany。測量方法為將裸鼠以頸椎折斷法使其死亡後，立即量測裸鼠皮膚參數以取得各項實驗數據。其中經皮水分散失數值 (TEWL) 以及皮膚彈性係數 (Skin Elasticity) 是量測裸鼠背部近尾端的部位，皮膚水分含量 (Skin Hydration) 為量測裸鼠背部四點及腹部兩點共六點取其平均值。

NSAID 類藥物高效液相層析法開發

本研究 10 種 NSAID 類藥物高效液相層析法的開發，使用 Bioshil Aqu-ODS-W Colum (4.6 mm i.d. x 250 mm) 管柱。流動相組成以 water (1% acetic acid) 和 methanol 不同比例混合。層析管柱恆溫箱 (column oven) 溫度設定 40 °C。本實驗利用紫外線/可見光檢測器測定，相關條件及實驗圖譜詳列於附表 2 及圖 1。

NSAID 類藥物體外穿皮預試驗

本研究選定 10 種 NSAID 類藥物進行體外穿皮試驗，俟 HPLC 分析條件建構完成後，便進行 NSAID 藥物的溶解度試驗以及體外穿皮試驗。在體外穿皮試驗中，使用的儀器為 Franz-type diffusion cells 垂直式穿皮實驗系統，給藥端置入藥物的飽和溶液及少量藥物量以維持飽和濃度狀態；受藥端置入含 0.05% 防腐 NaN₃ 的 phosphate buffer (10mM KH₂PO₄, pH 值調整為 7.0)；磁石攪拌速率為每分鐘 300 轉；恆溫水流設為 37°C。

角質層中 Ceramide 含量試驗

目前研究角質層 Ceramide 含量的分析方法常見的為 TLC (AMD-HPTLC)、GC/MS、HPLC、LC/MS、IR (near-IR 或 FTIR) 以及 DSC (Differential scanning calorimetry)，本

研究正在致力於開發以 IR 與 DSC 相關設備來探討分析裸鼠皮膚角質層中 Ceramide 含量以及相關結構特性，以期建立方便準確的分析方法來對 Ceramide 含量以及相關特性分析求得準確的量化參數，再將這些參數用以修正不同個體間皮膚的差異進行標準化後再迴歸運算。

四、結果與討論

個別皮膚特性測量

在個別裸鼠皮膚特性測定的實驗中，測量方法為將裸鼠以頸椎折斷法使其死亡後，立即量測裸鼠皮膚參數以取得各項實驗數據。曾經嘗試過以膠帶固定裸鼠，但因裸鼠會躁動掙扎而干擾實驗操作，由於 TEWL 實驗數值極易因為氣流的影響或是量測位置的些微變動而造成誤差，所以最後折衷採取頸椎折斷法使其死亡後進行實驗來觀察不同裸鼠的各項皮膚特性。附表一為已完成皮膚特性測定的 30 隻裸鼠數據，將不同項目的數據進行迴歸統計分析 (TEWL 與 Hydration 之間的相關性、Hydration 與 Elasticity 之間的相關性及 TEWL 與 Elasticity 之間的相關性)，尚未觀察出不同皮膚特性相互影響的關係程度。俟往後量測的裸鼠樣本數增大後再討論其彼此間的相關性。

NSAID 類藥物高效液相層析法開發

本研究 10 種 NSAID 多為弱酸類藥物，所以流動相添加少量的 Acetic acid 以避免藥物分子解離。在流動相組成比例方面，由於 Aspirin 及 Tenoxicam 較早被沖提出來 (滯留時間約 4-5 分鐘)，所以在 Aspirin 及 Tenoxicam 的分析條件中，流速調整為 0.8 mL/min，另外 methanol 與 H₂O (1% acetic acid) 的比例也調低為 75:25 (v/v)，以避免待測藥物的波峰受到溶劑波峰的干擾。整體來說，10 種待測藥物皆可在 10 分鐘內完成分析，而用此條件來分析體外穿皮吸收試驗的檢品也可得到良好

的分析效果，為一簡單有效的分析條件。

分析時間以及資源。

NSAID 類藥物體外穿皮預試驗

若以多種藥物的混合溶液進行體外穿皮試驗，可能會產生不同藥物彼此間的交互影響，所以在穿皮試驗方法設計上，每隻裸鼠取下的鼠皮獨立進行單一種藥物飽和溶液的穿皮試驗，以排開混合溶液所可能造成的誤差因素。而進行 10 種 NSAID 藥物的 72 小時體外穿皮預試驗結果顯示，10 個 NSAID 藥物大多在 30 至 40 小時可達到穩定狀況，因此未來在個別藥物的體外穿皮試驗設計上，試驗流程約可設定為 48 小時甚至更早的時間點，以節省

五、參考文獻

- [1] Geinoz S, Guy RH, Testa B, Carrut PA : Quantitative Structure-Permeation Relationships (QSPeRs) to Predict Skin Permeation: A Critical Evaluation 21:83-92, 2004
- [2] Al-Saidan SM.: Transdermal self-permeation enhancement of ibuprofen. J Control Release. 100:199-209, 2004
- [3] Levin J, Maibach H., The correlation between transepidermal water loss and percutaneous absorption: an overview. J Control Release. 103:291-299, 2005
- [4] Perry RJ, Ridgway ND.:Molecular mechanisms and regulation of ceramide transport. Biochim Biophys Acta. 1734:220-234, 2005

Table 1 裸鼠的各項皮膚特性實驗數據

Nude mice	Weight(g)	TEWL (g/hm ²)	Hydration	Elasticity
1	16.6	4.1	62.05	0.1273
2	17.2	8.5	63.05	0.2578
3	17.3	4.7	60.55	0.2565
4	18	6.1	64.52	0.3107
5	18.2	4.2	49.78	0.2153
6	18.9	5.3	52.1	0.2577
7	19	5.6	65	0.2455
8	19	6.3	66.48	0.078
9	19.3	7.8	53.63	0.8448
10	19.3	7.7	59.83	0.514
11	19.3	7.6	44.78	0.1495
12	20.8	6.3	60.73	0.5672
13	21.6	5.9	57.08	0.2645
14	21.9	8.6	62.17	0.4057
15	22	5.7	54	0.2686
16	22	5.9	54.25	0.2043
17	22	8.9	69.28	0.5581
18	22.1	7	68.78	0.6196
19	22.3	8.6	40.85	0.1154
20	22.5	7.4	63.1	0.2218
21	22.6	9.1	74.37	0.5238
22	22.7	6.6	56.92	0.5366
23	22.9	9.1	67.57	0.2368
24	23	8.2	59.7	0.3393
25	23.1	8.6	43	0.2717
26	23.5	5.7	72.23	0.5672
27	23.6	6.5	66.92	0.376
28	23.7	5.4	63.28	0.5729
29	24.5	8	62.18	0.4938
30	25.6	5.2	70.08	0.3654

Table 2. 10 種 NSAID 藥物 HPLC 分析條件

NSAIDs	Mobile Phase	Wavelength	Flow rate
Aspirin	MeOH : H ₂ O ^a = 75 : 25	282	0.8ml
Diclofenac sodium salt	MeOH : H ₂ O = 82 : 18	275	1ml
Diflunisal	MeOH : H ₂ O = 82 : 18	250	1ml
Flufenamic acid	MeOH : H ₂ O = 82 : 18	285	1ml
Ibuprofen sodium	MeOH : H ₂ O = 82 : 18	226	1ml
Ketoprofen	MeOH : H ₂ O = 82 : 18	260	1ml
Nabumetone	MeOH : H ₂ O = 82 : 18	250	1ml
Naproxen	MeOH : H ₂ O = 82 : 18	240	1ml
Piroxicam	MeOH : H ₂ O = 82 : 18	315	1ml
Tenoxicam	MeOH : H ₂ O = 75 : 25	375	0.8ml

^a : H₂O 含有 1% Acetic acid

Figure 1 10 種 NSAID 藥物 HPLC 分析圖譜(濃度為 10 µg/ml)

